

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in Organismi Modello nella Ricerca
Biomedica e Veterinaria
XXVII ciclo

Analisi degli effetti della temperatura su alcuni aspetti del
comportamento della spigola (*Dicentrarchus labrax*) e del
pesce zebra (*Danio rerio*)

Coordinatore
Prof. Paolo de Girolamo

Dottoranda
Amanda Tedesco

Tutor
Dott. Augusto Vitale

Co-Tutor
Dott.ssa Arianna Manciocco

Tesi di Dottorato 2015

*Se c'è una cosa che puoi fare o che pensi di poter fare, cominciala:
nell'ardimento c'è genialità, potenza e magia*

Johann Wolfgang Goethe

Sommario

Sommario	2
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 Lo stress negli animali.....	5
1.2 Lo stress nei pesci.....	7
1.3 Lo stress termico nei pesci	9
1.4 Studio del comportamento nei pesci	10
1.5 Gli studi che impiegano i pesci per generare modelli animale.....	13
1.6 La scelta delle specie impiegate nel presente lavoro.....	14
1.7 La scelta dei test comportamentali	17
1.8 Durata del trattamento termico.....	18
1.9 Scopo del lavoro.....	19
2 MATERIALI E METODI.....	21
2.1 <i>Dicentrarchus labrax</i>	21
2.1.1 Stabulazione spigola	21
2.1.2 Trattamento spigola	22
2.1.3 Test comportamentali spigola.....	24
2.1.4 Etogramma spigola	29
2.1.5 Analisi dei filmati spigola.....	31
2.1.6 Analisi statistica spigola	32
2.2 <i>Danio rerio</i>	32
2.2.1 Stabulazione dei <i>wild-type</i> linea commerciale (primo gruppo)	32
2.2.2 Condizione termica dei <i>wild-type</i> linea commerciale (trattamento di breve periodo).....	33
2.2.3 Stabulazione dei <i>wild-type</i> linea commerciale (secondo gruppo)	35
2.2.4 Condizione termica dei <i>wild-type</i> linea commerciale (trattamento di lungo periodo)	36
2.2.5 Stabulazione dei <i>wild-type</i> linea AB.....	37
2.2.6 Condizione termica dei <i>wild-type</i> linea AB (trattamento di lungo periodo)	38
2.2.7 Test comportamentali condotti sul pesce zebra	39

2.2.8 Etogramma pesce zebra	44
2.2.9 Analisi dei filmati pesce zebra.....	47
2.2.10 Analisi statistica pesce zebra	48
3 RISULTATI.....	49
3.1 Trattamento termico in <i>Dicentrarchus labrax</i>	49
3.1.1 Test di foraggiamento	49
3.1.2 Test olfattivo.....	50
3.1.3 <i>Mirror test</i>	51
3.1.4 Test aversivo	53
3.1.5 Peso degli animali.....	54
3.2 Trattamento termico di breve periodo in <i>Danio rerio wild-type</i> linea commerciale.....	55
3.2.1 <i>Novel diving tank test</i>	55
3.2.2 <i>Dark/light preference test</i>	59
3.2.3 <i>Group preference test</i>	62
3.2.4 Peso degli animali.....	65
3.3 Trattamento termico di lungo periodo in <i>Danio rerio wild-type</i> linea commerciale	65
3.3.1 <i>Novel diving tank test</i>	65
3.3.2 <i>Dark/light preference test</i>	70
3.3.3 <i>Group preference test</i>	73
3.3.4 <i>Mirror test</i>	76
3.3.5 Peso degli animali.....	78
3.4 Trattamento termico di lungo periodo in <i>Danio rerio wild-type</i> linea AB	79
3.4.1 <i>Novel diving tank test</i>	79
3.4.2 <i>Dark/light preference test</i>	82
3.4.3 <i>Group preference test</i>	83
3.4.4 <i>Mirror test</i>	83
3.4.5 Peso degli animali.....	85

4 DISCUSSIONE.....	87
4.1 <i>Dicentrarchus labrax</i>	87
4.1.1 Trattamento termico di lungo periodo	87
4.2 <i>Danio rerio</i>	90
4.2.1 Trattamento termico di breve periodo dei <i>wild-type</i> linea commerciale	90
4.2.2 Trattamento termico di lungo periodo dei <i>wild-type</i> linea commerciale.....	96
4.2.3 Trattamento termico di lungo periodo dei <i>wild-type</i> linea AB	102
5 CONCLUSIONI.....	106
Bibliografia	108
Ringraziamenti	123

1 INTRODUZIONE

1.1 Lo stress negli animali

Storicamente, in biologia e medicina, il concetto di stress fu introdotto da H. Selye nel 1936, che lo definì come “la risposta non specifica dell’organismo ad ogni richiesta effettuata ad esso” nell’ambito di una ricerca inerente le risposte fisiologiche degli animali in seguito alla somministrazione di sostanze nocive. Egli, nel corso di questo studio, aveva evidenziato che i ratti sottoposti a condizioni di stress erano più soggetti ad ammalarsi (Selye, 1936).

Tutti gli elementi di disturbo che implicano una modifica dello stato di omeostasi di un organismo vengono comunemente definiti agenti o stimoli stressogeni per esso (Chrousos e Gold, 1992).

Il concetto di stress negli anni è stato esteso a molti ambiti e, ad oggi, ne sono disponibili numerosissime definizioni; a causa della sua complessità, una buona definizione di stress deve cercare di descrivere differenti fenomeni osservabili a livello di cellule, organi, organismi e popolazioni, come, per esempio, quella fornita nel 1992 da Chrousos e Gold: “*stress is defined as a condition in which the dynamic equilibrium of animal organisms called homeostasis is threatened or disturbed as a result of the actions of intrinsic or extrinsic stimuli, commonly defined as stressors*”

Lo stress è parte integrante della vita naturale degli animali e questo non è necessariamente un male. Tutte le forme di vita hanno evoluto meccanismi per far fronte ad esso. Ad oggi è riconosciuto che, come l’essere umano, anche gli altri animali possono soffrire degli effetti di un eccesso di stress, sviluppando sintomi simili di sofferenza. Proprio come capita alla specie umana, anche gli animali che hanno esperienza di un livello di stress eccessivo, possono diventare vulnerabili alle malattie, oppure avere uno sviluppo anomalo o non avere successo nella riproduzione (Moberg, 1985; 2000).

Sempre Selye fu il primo ad introdurre due diverse tipologie di stress che chiamò *distress* o stress negativo ed *eustress* o stress positivo. Questa distinzione fece emergere il concetto di stress inteso anche come processo finalizzato ad un migliore adattamento all’ambiente e quindi come stimolo necessario ad una reazione di adattamento. Il *distress* si ha quando gli stimoli stressanti sono tali da far permanere l’attivazione dell’organismo (a livello ormonale) anche in assenza di tali stimoli, oppure quando l’organismo reagisce in modo sproporzionato a stimoli di lieve entità. L’*eustress*, invece, si ha quando uno o più stimoli, anche di natura diversa, allenano la capacità di adattamento individuale (Gabassi, 2003; Selye, 1936).

In una situazione di *distress* l’organismo è costretto a sottrarre energie alle funzioni biologiche primarie, come il sistema immunitario, la riproduzione o la crescita per far fronte allo stimolo

stressante; quindi se non interviene un qualche fattore per limitare questo stato, l'animale diventerà maggiormente vulnerabile (Moberg, 2000).

In alcuni studi, Moberg, propose un modello di stress animale al fine di facilitare la misura di questo fattore e la valutazione di come effettivamente questo influisca nella vita di un animale. Questo modello si divide in tre fasi generali: il riconoscimento da parte di un organismo di un fattore stressogeno, l'attivazione di una reazione di difesa verso questo fattore e le conseguenze della risposta a detto fattore di stress. È in quest'ultima fase che noi possiamo verificare se, in seguito allo stress, l'animale ha vissuto un *distress* oppure se lo stress è stato vissuto come un breve episodio che non ha influito sul suo livello di benessere (Moberg, 1985; 2000).

Quando un animale percepisce uno stimolo stressogeno, mediante l'attivazione del sistema nervoso centrale, si ha l'organizzazione di una difesa al fattore di stress. Questa risposta è composta principalmente da quattro componenti: la risposta comportamentale, quella autonoma, quella neuroendocrina e quella immunologica. Se la reazione dell'animale riesce a contrastare lo stress si ristabilisce un equilibrio normale; se, invece, la reazione dell'animale non riesce a contrastare lo stress si ha un'alterazione delle normali funzioni biologiche, che può arrivare anche allo sviluppo di una patologia quando lo stress è eccessivo (Moberg, 1999). Sappiamo, comunque, che la prima reazione di un animale di fronte ad un fattore stressante è il tentativo di eliminare e/o evitare lo stimolo nocivo; per esempio, in situazioni ambientali non idonee l'animale tenderà a spostarsi (Moberg, 1999, 2000).

Attraverso la risposta allo stress, un animale tenta di far fronte all'agente stressogeno modificando le sue attività biologiche. Questo implica una riallocazione dell'energia (Wendelaar Bonga, 1997). In letteratura, la reazione ad una situazione o ad uno stimolo avverso è stata definita *coping* (Koolhaas *et al.*, 1999; Wechsler, 1995). Il fatto che un animale percepisca l'avversità di una situazione e attui una reazione sia a livello fisiologico che comportamentale suggerisce che il *coping* è un meccanismo adattativo. Possiamo affermare che il *coping* ha avuto successo quando lo stress è stato ridotto oppure quando è stata rimossa la situazione avversa (Wechsler, 1995).

Misurare lo stress è da sempre riconosciuto un problema complesso, poiché si applica la parola stress ad una vasta schiera di situazioni molto differenti tra di loro. E anche se esistono varie misure dello stress, che si basano su valutazioni dello stato dei sistemi endocrino, nervoso e immunologico e/o delle variazioni del comportamento, ognuna di queste fornisce solo una parziale stima dei differenti tipi di stress (Moberg, 2000).

A causa di numerosi studi che hanno rilevato la presenza di segnali comunemente associati allo stress, come per esempio la produzione di cortisolo, in situazioni non normalmente associabili allo stress, come l'accoppiamento degli stalloni (Colborn *et al.*, 1991), si può facilmente intuire quanto si debba esser cauti nell'affermare che una particolare situazione o un particolare stimolo siano fonte di stress o meno per un animale.

Inoltre, quando si studia lo stress, uno dei maggiori problemi che si riscontra è la variazione inter-individuale degli animali ad uno stesso stress, poiché non necessariamente uno stesso stimolo viene percepito con la stessa intensità da individui differenti, oppure, di fronte ad un medesimo stimolo, si possono avere reazioni diverse. Infatti diversi fattori, quali esperienze precedenti, corredo genetico, età dell'animale o dinamiche sociali, possono influire sulla risposta ad uno stesso stimolo stressante da parte di animali appartenenti alla stessa specie (Blecha *et al.*, 1983; Henry, 1992; Marple *et al.*, 1972; Mason *et al.*, 1991).

Motivo per cui valutare in modo univoco un fattore stressante per un animale o per una popolazione può risultare estremamente complesso. Gli esperimenti in laboratorio possono aiutare a comprendere meglio quali sono gli effetti di uno stress e quali sono le principali reazioni di un animale ad uno stimolo stressogeno (Moberg, 2000).

1.2 Lo stress nei pesci

Per gli organismi acquatici diverse perturbazioni ambientali possono rappresentare una potenziale causa di stress. Infatti, a causa delle loro caratteristiche, vivono a stretto contatto con un ambiente che è molto spesso dinamico. Quindi nel corso dell'evoluzione hanno avuto bisogno di sviluppare una serie di complessi meccanismi atti a ripristinare le condizioni di equilibrio per espletare le normali funzioni fisiologiche (Harper e Wolf, 2009).

Generalmente è riconosciuto che uno stimolo esterno di tipo stressante porta nei pesci all'attivazione di una serie di risposte che possono esser suddivise in:

- Risposta primaria: caratterizzata dalla percezione di uno stato alterato con conseguente attivazione di alcuni centri cerebrali. Seguono risposte neuroendocrine/endocrine che portano al cospicuo rilascio di ormoni (catecolamine e corticosteroidi) con alterazione nei livelli dei neurotrasmettitori
- Risposta secondaria: caratterizzata dall'azione degli ormoni rilasciati a livello del sangue e dei tessuti, i quali attivano una serie di cambiamenti a carico dell'organismo, inclusi l'incremento della gittata cardiaca, il consumo di ossigeno, la mobilitazione dell'energia, il

disturbo del bilancio idrominerales e alcune modifiche nei processi metabolici, fino ad arrivare all'alterazione delle difese immunitarie

- Risposta terziaria: caratterizzata da una serie di cambiamenti a livello dell'organismo e della popolazione, come alterazione della capacità di crescita e inibizione della riproduzione, modificazione di alcuni comportamenti, fino alla ridotta capacità di tollerare ulteriori fattori di stress (quindi maggiore vulnerabilità, per esempio, alle malattie) (Barton, 2002; Iwama, 1998; Wendelaar Bonga, 1997).

Molti elementi ambientali possono alterare lo stato degli animali acquatici, tra i più importanti troviamo gli inquinanti ambientali (Camargo e Alonso, 2006), la concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua (Beamish, 1978; Bickler e Buck, 2007), la temperatura (Beamish 1978; Dickson *et al.*, 2002; Fuiman e Batty, 1997; Koumoundouros *et al.*, 2002a; Wieser e Kaufmann 1998) e la salinità (Beamish, 1978; Brett, 1987). I pesci risultano particolarmente vulnerabili alle variazioni dei parametri chimico-fisici dell'ambiente acquatico a causa delle loro particolari caratteristiche anatomico-funzionali, quali un sistema di percezione a livello del tegumento molto sviluppato e la presenza delle branchie (Blaxter, 1992; Evans, 1987; Mallat, 1985). Per esempio, la presenza di agenti xenobiotici causa elevato stress nelle popolazioni animali (Bucke, 1993; Harvey *et al.*, 2008). Infatti esiste una discreta quantità di informazioni sugli effetti neurotossici di diversi xenobiotici nelle specie ittiche, le quali agiscono da accumulatori delle sostanze dannose e ne manifestano gli effetti in misura spesso superiore rispetto agli organismi che occupano una posizione più elevata nella catena alimentare (Colborn *et al.*, 1993; 1998). Inoltre, nel caso dei pesci, sappiamo che caratteristiche quali il pH, la temperatura, la salinità dei bacini idrici sono fattori limitanti per la sopravvivenza di questi animali (Schreck, 1981). E' ben noto che variazioni in questi parametri inducono una serie di risposte adattative di natura fisiologica che si sono evolute per far fronte ai fattori di stress e che sono in gran parte omologhe a quelle presentate da altri vertebrati (Wendelaar Bonga, 1997).

Inoltre i pesci sono particolarmente vulnerabili a livello delle branchie, le quali possono essere danneggiate da agenti stressanti con effetti negativi su tutte le loro funzioni. Per esempio, è stato osservato che agenti chimici di natura tossica, bassi livelli del pH dell'acqua, alte concentrazioni di alluminio, rapidi e accentuati cambi di temperatura dell'acqua o manipolazioni frequenti degli animali causano dei considerevoli cambiamenti a livello strutturale nelle branchie, minando il loro funzionamento. In alcuni casi è stato osservato che lo stress induce un'accentuata apoptosi e necrosi

nelle branchie, oppure altera il bilancio ionico dell'animale mediante il disturbo degli scambi ionici che avvengono a loro livello (Wendelaar Bonga, 1997).

Così come in altri organismi, anche nei pesci un aspetto centrale della reazione ad uno stress è la riallocazione dell'energia metabolica, spostandola dalle attività non direttamente coinvolte nella sopravvivenza, come la crescita corporea o la riproduzione, verso quelle attività che permettono il mantenimento dell'omeostasi interna, tipo la respirazione, la regolazione idrominerales e la riparazione dei tessuti (Schreck, 1981; 1990). Questo può portare a ridurre la *performance* dei pesci durante gli stress prolungati e nella fase di ripresa che segue lo stress (Schreck, 1990). Nei pesci si osserva frequentemente una crescita ridotta o una crescita negativa quando esposti ad uno stimolo stressogeno, infatti l'osservazione della perdita di massa corporea è stata ampiamente applicata allo studio degli effetti degli stress prolungati sul benessere dei pesci. La ridotta crescita è stata osservata per stress di tipo fisico, sociale e chimico, come cambiamenti rapidi di temperatura, affollamento negli allevamenti, alcuni tipi di inquinanti, bassi valori del pH dell'acqua, frequenti catture e manipolazioni degli animali (Wendelaar Bonga, 1997). La perdita di peso nei pesci sotto stress può essere imputata a differenti fattori, poiché quando presente uno stimolo stressogeno il pesce può diminuire il suo appetito e la sua attività di foraggiamento, può diminuire l'assimilazione del cibo oppure può aumentare il suo tasso metabolico con conseguente perdita di peso (Barton e Schreck, 1987; Peters, 1982; Pickering *et al.*, 1982). È noto, però, che non tutti i pesci reagiscono ad uno stress con un incremento del tasso metabolico; infatti è stato osservato anche che in alcune specie di pesci si verifica un abbassamento del tasso del metabolismo, una reazione adattativa che viene definita *metabolic depression* (van Ginneken e van den Thillart, 2009).

1.3 Lo stress termico nei pesci

La temperatura dell'acqua è un fattore cruciale per tutte le specie acquatiche ectotermiche, inclusi i pesci (Atkinson, 1996; Jobling, 1996; Manciocco *et al.*, 2014). Infatti, l'acclimatazione termica può influire sulla crescita, la riproduzione, il comportamento alimentare e il metabolismo dei pesci (Pörtner e Knust, 2007).

Molti studi condotti sull'influenza della temperatura sulla salute dei pesci furono realizzati in natura nei fiumi degli Stati Uniti. In questi lavori è stato rilevato che nei pesci le variazioni fisiologiche e comportamentali sono più evidenti con le temperature basse invece che con quelle alte; infatti con le basse temperature si può notare un'attività locomotoria anomala, con spostamenti verso la superficie dell'acqua, una perdita parziale della capacità visiva degli animali fino ad arrivare alla loro morte, a causa dell'incapacità di adattarsi a un simile regime termico (Agersborg, 1930). Si è

ipotizzato che la temperatura controlli la respirazione, per cui risulterebbe essere indirettamente il fattore più importante nella vita di un pesce. Le acque pure troppo fredde diventano quasi sature di ossigeno, interferendo con la normale funzione branchiale, motivo per cui molto spesso in natura si assiste ad una copiosa moria di pesci durante gli inverni estremamente rigidi (Agersborg, 1930; Bennett e Judd, 1992; Miller, 1940; Simpson, 1953).

È noto, però, che in acque inquinate sono le alte temperature a rappresentare un rischio maggiore per la salute dei pesci, poiché con le alte temperature aumenta la tossicità e la concentrazione degli elementi inquinanti (Agersborg, 1930; Manciocco *et al.*, 2014).

Ad oggi sappiamo che la temperatura è una caratteristica ambientale che agisce sul tasso metabolico di un animale poiché incide sulla velocità delle reazioni chimiche e sul consumo dell'ossigeno, i quali crescono all'aumentare della temperatura (Clarke e Fraser, 2004; Hazel e Prosser, 1974), mentre alle basse temperature c'è una riduzione del consumo di cibo in relazione alla diminuzione dei processi metabolici (Clarke, 2003; Clarke e Fraser, 2004).

Molti studi sono stati condotti per comprendere come varia l'attività dei pesci al variare delle condizioni termiche e molti autori sono concordi nell'affermare che le basse temperature nei pesci inducono attività letargiche, mentre le alte temperature inducono attività frenetiche (Beitinger *et al.*, 2000), così come molte specie di pesci sarebbero meglio adattate a tollerare temperature prossime alla soglia superiore di sopravvivenza, piuttosto che quelle vicine alla soglia inferiore di sopravvivenza (Bennett e Judd, 1992; Mundahl, 1990). La tolleranza alle alte temperature che si manifesta in alcuni pesci è il risultato di una serie di adattamenti che consentono loro di assumere ossigeno attraverso un incremento dell'area epiteliale branchiale o attraverso un aumento del tasso di ventilazione (Farrell *et al.*, 1980; Taylor e Barrett, 1985).

1.4 Studio del comportamento nei pesci

Le conoscenze etologiche possono essere uno strumento utile per la valutazione di come i parametri ambientali e le loro modificazioni possano influenzare la vita degli animali. Infatti il comportamento rappresenta un collegamento tra la fisiologia di un organismo e il suo ambiente, poiché rappresenta la risposta selettiva dell'organismo che deve adattarsi costantemente a tutti gli aspetti dell'ambiente esterno che mutano (Little e Brewer, 2001).

Attualmente molti sono gli ambiti biologici che si avvalgono dell'etologia come strumento di aiuto nella gestione degli animali, e vanno dal *management* e conservazione della fauna selvatica (Festa-Bianchet e Apollonio, 2003), alla conduzione di allevamenti di animali conformi al loro benessere,

sia per fini scientifici che per fini commerciali (Brännäs e Johnsson, 2008; Hughes e Duncan, 1988; Olsson *et al.*, 2003).

Sappiamo che diversi fattori ambientali, quali la composizione e concentrazione dei parametri chimico-fisici dell'ambiente, possono indurre modificazioni nel comportamento animale (Festa-Bianchet e Apollonio, 2003; Manciocco *et al.*, 2014; Valiela *et al.*, 1997). Quindi lo studio dei comportamenti fondamentali per la sopravvivenza di un organismo, come l'attività di foraggiamento, di locomozione o la capacità di rispondere ad uno stimolo esterno, può dare un aiuto nel comprendere quali effetti i cambiamenti ambientali producono su una popolazione di animali (Domenici *et al.*, 2007).

I pesci, essendo organismi che vivono in una enorme varietà di ambienti, sono dotati di capacità adattative, anche comportamentali, estremamente ampie riuscendo a far fronte a molteplici modifiche dell'ambiente circostante (Wendelaar Bonga, 1997). Per esempio, quando in presenza di fattori di disturbo, questi animali possono facilmente cambiare la loro attività di nuoto, le interazioni sociali o l'attività di foraggiamento (Abrahams e Colgan, 1985; Domenici *et al.*, 2007; Schreck, 1990). Alterazioni chimico-fisiche dell'acqua portano a delle modifiche delle strategie anti-predatorie, così come influenzano l'attività di *schooling* di molte specie (Domenici *et al.*, 2002; Israeli e Kimmel, 1996; Lefrancois e Domenici, 2006). In generale, è possibile osservare un cambiamento nell'attività di nuoto al variare della temperatura (Claireaux *et al.*, 2006; Koumoundouros *et al.*, 2002a, b; Scherer e Harrison, 1988), della salinità (Gonzales e MacDonald, 1992; Postlethwaite e MacDonald, 1995) e della concentrazione di ossigeno (Metcalf e Butler, 1984).

L'attività di nuoto è uno dei parametri comportamentali che maggiormente viene modificato in seguito all'esposizione ad un stress. A seconda della specie, si possono osservare un incremento dell'attività locomotoria o una sua diminuzione; per esempio, il pesce serra (*Pomatomus saltatrix*) esposto ad una temperatura inappropriata mostra un rapido aumento della sua attività di nuoto, mentre nella stessa situazione, la tautoga (*Tautoga onitis*) mostra una improvvisa diminuzione della sua attività locomotoria (Schreck *et al.*, 1997).

Anche l'esposizione ad alcuni inquinanti, come l'amianto, in molte specie di pesci porta ad una variazione dell'attività di nuoto che diventa caotica (Belanger *et al.*, 1986).

In diverse specie ittiche si è osservata una modifica del comportamento anti-predatorio in relazione alle variazioni chimico-fisiche dell'ambiente (Domenici *et al.*, 2007). Per esempio, spesso si è potuto osservare un'alterazione della risposta di fuga, intesa come direzione e velocità degli

animali, al variare della temperatura o della disponibilità di ossigeno, anche se con rilevanti differenze specie-specifiche (Domenici e Blake, 1991; Lefrancois *et al.*, 2005). In alcuni studi è stato possibile osservare che anche lo stress da manipolazione da parte dell'uomo induce i pesci a compiere errori nelle loro tecniche di fuga, andando ad influenzare la loro vulnerabilità di fronte ad un atto predatorio (Olla *et al.*, 1992; 1998).

Inoltre, in molti lavori condotti su specie di ciprinidi e ciclidi, è stato possibile osservare alterazioni dell'attività di *schooling*, soprattutto a livello di struttura e dinamica del banco, in condizioni di stress ambientale (Domenici *et al.*, 2002; Israeli e Kimmel, 1996). L'attività di *schooling*, considerata anche una strategia anti-predatoria, è fortemente influenzata dall'esposizione agli agenti inquinanti, i quali inducono una dispersione del banco o portano i pesci a nuotare vicini in modo disordinato, incrementando la percentuale di predazione (Sullivan *et al.*, 1978).

L'attività di foraggiamento implica l'attivazione di diverse capacità, tra cui la reazione ad uno stimolo visivo e/o chimico e il cercare/cacciare la preda (Schreck *et al.*, 1997). Uno stato di stress può influire su tutte queste componenti e risultare nel mancato consumo di cibo. Per esempio, lo stress da cattura cui sono sottoposti i pesci sia negli allevamenti che nei laboratori di ricerca, induce una perdita dell'attività di foraggiamento per un intervallo di tempo vario, che dipende dalla specie che subisce lo stress e dal livello di stress vissuto (Pickering *et al.*, 1982). Il ritorno ad una normale attività di foraggiamento implica che l'equilibrio dell'animale sia stato ristabilito (Schreck *et al.*, 1997).

Anche se molti studi pongono l'attenzione su come uno stress altera il comportamento dei pesci, andando quindi a modificare o danneggiare alcuni aspetti di quelle attività essenziali alla loro sopravvivenza, non dobbiamo dimenticare che, molto spesso, le modifiche del comportamento in seguito ad uno stimolo stressante sono, in realtà, adattative, risultando in un incremento delle possibilità di sopravvivenza degli animali (Schreck *et al.*, 1997).

Recentemente sono in aumento gli studi inerenti il benessere dei pesci negli allevamenti e in questo ambito il comportamento ha assunto un'importanza di rilievo, poiché diversi parametri comportamentali vengono modificati da uno stato di malessere sia fisico che psichico degli animali (Fletcher, 1997). Molti autori sostengono che alcuni comportamenti anche nei pesci possono esser interpretati come delle vere e proprie stereotipie causate da condizioni di allevamento non appropriate (Lymbery, 2002; Kristiansen *et al.*, 2004). Quello che molti autori suggeriscono è di porre particolare attenzione alle conoscenze specie-specifiche del repertorio comportamentale delle singole specie e a tutte quelle modifiche comportamentali età-dipendenti che si possono presentare

a seconda della specie presa in considerazione, poiché solo attraverso una conoscenza precisa di questi dati sarà possibile garantire un ambiente idoneo alle esigenze specie-specifiche degli animali (Ashley, 2007).

1.5 Gli studi che impiegano i pesci per generare modelli animale

I pesci dal 1960 in poi, hanno rappresentato una specie che ha trovato sempre più impiego nella ricerca scientifica, anche se tuttora non raggiunge i numeri di altre specie (come topi e ratti). Infatti, dalla settima relazione sulle statistiche riguardanti il numero di animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici negli Stati membri dell'Unione europea risulta che nel 2011 oltre un milione di pesci è stato impiegato nella ricerca scientifica (REPORT, 2013).

Gli ambiti scientifici in cui i pesci sono utilizzati sono piuttosto vari. Principalmente li troviamo impiegati in studi di: tossicologia, genetica, biomedicina, neurobiologia, ricerca sul cancro, endocrinologia, ecologia, gerontologia e biologia dello sviluppo (Bolis *et al.*, 2001; Powers, 1989).

Gran parte della ricerca scientifica che impiega i pesci per creare modelli animali è di tipo tossicologico, poiché i pesci sono particolarmente utili per segnalare rischi e pericoli potenziali di un inquinamento delle acque causato da tossine o agenti chimici (Powers, 1989). Gli approcci in questo tipo di studio sono principalmente quello morfologico e fisiologico, anche se non manca un approccio di tipo comportamentale (Bolis *et al.*, 2001; Kane *et al.*, 2005).

Inoltre i pesci sono diventati animali modello molto usati nelle ricerche inerenti la carcinogenesi. Differenti specie di pesci sono usate come indicatori di sviluppo di processi tumorali in condizione di contaminazione ecologica. Molte, come il medaka (*Oryzias latipes*) o il pesce zebra (*Danio rerio*) sono particolarmente sensibili alle sostanze cancerogene poiché, a causa delle branchie e dell'epitelio, hanno uno stretto contatto con l'ambiente esterno e sviluppano molto rapidamente processi tumorali (Bolis *et al.*, 2001; DeKoven *et al.*, 1992).

Proprio il pesce zebra (chiamato anche danio zebrato) negli ultimi anni è diventato sempre più presente all'interno dei laboratori di ricerca. Gli studi per cui viene impiegato sono numerosissimi, poiché è un animale che ben si adatta alla creazione di ceppi mutanti e per il basso costo del suo allevamento (Gerlai *et al.*, 2006). Originariamente, il danio zebrato era impiegato principalmente per le ricerche di embriogenesi e biologia dello sviluppo, poiché risulta particolarmente semplice seguirne l'accrescimento, essendo un animale a sviluppo esterno e con uova trasparenti (Dooley e Zon, 2000; Zon, 1999). Con gli anni il suo impiego si è esteso a moltissimi altri ambiti di ricerca, infatti oggi lo troviamo come modello animale di moltissime patologie umane (Santoriello e Zon, 2012): malattie cardiache (Stainier *et al.*, 1996), muscolari (Bassett e Currie, 2003), ematiche

(Brownlie *et al.*, 1998), renali (Swanhart *et al.*, 2011), tumorali (Liu e Leach, 2011) e neurodegenerative (Xi *et al.*, 2011).

Sempre negli ultimi anni, il danio zebrato ha visto crescere il suo uso negli studi sulle sostanze di abuso ansiogeniche e ansiolitiche. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che il comportamento di questo piccolo pesce è influenzato da agenti psicotropi, come il diazepam, la caffeina, l'etanolo, la morfina, la cocaina, la nicotina, i barbiturici e gli allucinogeni (Braidà *et al.*, 2007; Cachat *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2009; Gerlai *et al.*, 2006; Kily *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2007; Renier *et al.*, 2007;). Essendo un campo di ricerca relativamente giovane, le neuroscienze comportamentali applicate al pesce zebra hanno adattato i tradizionali paradigmi comportamentali dei roditori a questo animale, tipo l'*open field test*, il *dark/light preference test* e il test dell'esposizione al predatore (Cachat *et al.*, 2011).

1.6 La scelta delle specie impiegate nel presente lavoro

In questo lavoro si sono studiati gli effetti della temperatura sul comportamento dei pesci per capire quali sono le condizioni termiche che possono rappresentare uno stress per questi animali e quali sono le strategie che vengono attuate per reazione.

In questo studio si sono scelti due organismi acquatici differenti, la spigola (*Dicentrarchus labrax*), specie marina, e il pesce zebra, specie d'acqua dolce.

La scelta è ricaduta su queste specie per motivi differenti.

***Dicentrarchus labrax*.** La spigola è stata scelta poichè è una specie fondamentale per l'economia di molti paesi del Mediterraneo, quindi la si trova molto spesso negli allevamenti intensivi di specie ittiche eduli. L'acquacoltura è il principale metodo di produzione di questa specie, anche se la pesca rappresenta ancora più del 10% della produzione complessiva di spigole in tutto il mondo. L'Italia fa parte di quei paesi del Mediterraneo che, a livello mondiale, sono tra i maggiori produttori di spigole. All'interno dell'UE, comunque, il principale produttore è la Grecia, seguita dalla Spagna (http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/seabass/index_it.htm).

La spigola è una specie euriterma ed eurialina che tollera ampie variazioni di temperatura e salinità. Tuttavia, variazioni di temperatura rapide ed elevate, influenzando la disponibilità di ossigeno e di anidride carbonica, possono rappresentare un fattore limitante per la crescita, quando non anche per la sopravvivenza, di questi animali (Koumoundouros *et al.*, 2002a). Scarsa è la letteratura esistente sulle risposte comportamentali esibite dalla spigola in presenza di modifiche dell'ambiente acquatico. L'attività del nuoto, intesa come velocità esibita e sviluppo muscolare raggiunto, è l'aspetto del comportamento maggiormente studiato in questa specie. Nella spigola europea si è

visto che la temperatura influenza gli aspetti sopra elencati, oltre a modificare il tasso metabolico (Claireaux *et al.*, 2006), lo sviluppo ontogenetico (Koumoundouros *et al.*, 2001) e il rapporto tra i sessi (Pavlidis *et al.*, 2000). In particolare, la velocità del nuoto risulta raddoppiare passando dai 7 ai 30° C (Claireaux *et al.*, 2006). La capacità di modificare rapidamente le caratteristiche del nuoto rappresenta un adattamento ecologico fondamentale, poiché aspetti quali l'interazione preda-predatore, il comportamento riproduttivo, la selezione dell'habitat, sono strettamente dipendenti dalla capacità dell'individuo di spostarsi (Armsworth, 2001; Reidy *et al.*, 2000).

Studiare le risposte comportamentali di questi animali al variare della temperatura può portare informazioni fondamentali applicabili ai modelli ecologici di riscaldamento globale (Cioni *et al.*, 2011; Manciocco *et al.*, 2014). L'incremento della temperatura è ritenuto essere uno dei principali effetti del cambiamento climatico e si ipotizza che questo incremento influirà negativamente sulle proprietà biologiche e chimiche dei sistemi acquatici, andando quindi ad intaccare la qualità dell'acqua e la composizione delle comunità acquatiche (IPCC, 2007). Inoltre, alcuni ambienti acquatici, come le lagune e le zone umide costiere, sono riconosciute essere particolarmente vulnerabili, quindi si ipotizza che su di essi questi cambiamenti influiranno in modo particolare (Eisenreich, 2005). E proprio negli ecosistemi costieri e lagunari, stagionalmente migrano dal mare le fasi giovanili di moltissime specie eurialine, come le spigole, che in questi particolari ambienti trovano le condizioni termiche e trofiche migliori per il loro sviluppo. Qui, occupando le zone di bassi fondali e delle praterie a fanerogame, riescono a trovare un efficiente riparo dalla pressione predatoria. Questa migrazione di avannotti dal mare viene chiamata “montata” o “rimonta” e rappresenta, per alcune zone dell'Italia, un fenomeno particolarmente imponente soprattutto durante i mesi primaverili; in particolare nelle zone dell'Alto Adriatico si assiste ad una migrazione degli avannotti di orata e di spigola, che vengono indicati con il termine collettivo di “pesce novello” o “novellame” (Granzotto *et al.*, 2001). Dopo un periodo più o meno lungo di permanenza nell'ambiente lagunare, caratterizzato da una fase di accrescimento rapido, i giovani ed i sub-adulti di queste specie eurialine migrano in mare per completare il loro ciclo biologico e riprodursi. In queste zone dell'Italia e in molte altre (valli di Comacchio, Orbetello, Gargano, Sardegna) è ampiamente diffusa una forma di allevamento estensivo che fa uso proprio di questo novellame, nota con il nome di “vallicoltura” (Brunelli, 1933; Ardizzone *et al.*, 1988), in cui, mediante l'utilizzo di differenti tipi di sbarramenti, si impedisce al novellame di tornare in mare dopo aver concluso il periodo di sviluppo all'interno delle lagune (Granzotto *et al.*, 2001). In Italia, inoltre, è molto diffusa l'allevamento in mare con gabbie flottanti (sommerse e/o sommergibili), un tipo di

allevamento ittico intensivo in acque marine con strutture galleggianti provviste di reti di contenimento (API/ICRAM 2007).

Monitorare il benessere di queste popolazioni è di fondamentale importanza per la conservazione di tradizioni storico-culturali, come quella della vallicoltura, e per il mantenimento di attività ittiche di rilevanza commerciale, come l'allevamento in acque marine. In quest'ottica, conoscere quali sono le principali variazioni comportamentali al variare della temperatura, può rappresentare un valido strumento al servizio della salvaguardia della salute delle popolazioni animali naturali. Poiché è ipotizzabile che, a causa del riscaldamento globale, le acque naturali subiranno delle modifiche nella loro condizione termica è di fondamentale importanza studiare la reazione di questi organismi, poiché in simili allevamenti sono impossibilitati alla ricerca di habitat maggiormente idonei alle loro esigenze.

Danio rerio. Il pesce zebra è stato scelto per questo studio poiché è una specie sempre più presente nei laboratori di ricerca; infatti negli ultimi anni il suo impiego negli studi scientifici è aumentato notevolmente. Inoltre, lo troviamo impiegato anche in studi inerenti l'ansia e lo stress e i disturbi neurocomportamentali che ne derivano.

Anche il danio zebrato è una specie euriterma, che tollera un intervallo di temperatura piuttosto ampio. In natura questa specie è presente in zone dove l'escursione termica delle acque tra inverno ed estate è molto intensa, con temperature dell'acqua estive di 38°C, invernali di 6°C (Spence *et al.*, 2008). In laboratorio sono stati condotti alcuni studi sulla tolleranza termica di questo piccolo pesce ed è stato possibile identificare come *range* massimo di tolleranza quello compreso tra i 6,7 e i 41,7°C (Cortemeglia e Beitinger, 2005; Schaefer e Ryan, 2006). È pratica comune nei laboratori allevare questa specie a 28-28.5°C, poiché questa è la temperatura a cui mostra un incremento della crescita più rapido e anche perché è la condizione termica ottimale per le femmine affinché abbiano una costante produzione di uova (Lawrence, 2007; Matthews *et al.*, 2002; Schaefer e Ryan, 2006). Non mancano comunque in letteratura informazioni sull'allevamento del *Danio rerio* a temperature comprese tra i 22 e i 30°C (Reed e Jennings, 2010).

Ad oggi pochi studi sono stati fatti su come varia il comportamento del danio zebrato al variare della temperatura; uno dei pochi lavori che ha preso in esame parametri comportamentali in relazione alla condizione termica è stato quello di Pritchard e colleghi (2001), il quale osservò un'influenza del trattamento termico sull'attività di nuoto, con pesci maggiormente attivi quando tenuti, anche per brevi periodi, a temperature più alte. Inoltre, dalla letteratura sappiamo che la temperatura nel pesce zebra influenza il sistema endocrino (Jin *et al.*, 2009), la stagionalità dei suoi

ritmi biologici-riproduttivi (Condon *et al.*, 2010) e la produzione di un fenotipo aerobico muscolature (McClelland *et al.*, 2006). Inoltre, dalla letteratura sappiamo che la temperatura di allevamento influenza la tolleranza termica dell'adulto; in particolare pesci allevati con temperature che giornalmente avevano delle forti fluttuazioni termiche risultavano essere più piccoli nelle dimensioni ma avevano una tolleranza termica maggiore. Sembra quindi che condizioni variabili di temperatura durante le 24 ore giornaliere aumentino la probabilità di sopravvivenza ai cambiamenti dell'ambiente, ma risultino energeticamente dispendiose (Schaefer e Ryan, 2006). Da un altro lavoro, condotto da Cortemeglia e Beitinger (2005), emerge che questo pesce riesce ad estendere la sua temperatura di tolleranza a soglie più alte o basse a seconda sia stato acclimatato, anche solo per pochi giorni, a temperature maggiori o minori, rafforzando l'ipotesi che la temperatura di acclimatazione, per questi animali, sia un fattore molto importante.

Essendo evidente che la temperatura rappresenta un parametro importante per la vita di questi pesci, focalizzare su eventuali soglie che possano rappresentare un fattore di stress permette di valutare l'ipotesi di indurre, negli studi su sostanze ansiolitiche, una situazione avversa mediante la variazione di temperatura, tecnica che potrebbe esser facilmente replicabile nei laboratori di ricerca con una spesa non eccessiva.

Dalla letteratura è emerso, inoltre, che molto spesso nei laboratori di ricerca scientifica vengono impiegati come animali di controllo (genericamente indicati *wild-type*) pesci zebra di provenienza commerciale (Bass e Gerlai, 2008; Egan *et al.*, 2009; Maximino *et al.*, 2010a). Ossia pesci geneticamente non conosciuti, acquistabili nei negozi di animali, aventi probabilmente un tasso di eterozigosi differente rispetto alle linee selezionate in laboratorio, e quindi con una potenziale elevata variabilità fisiologica e comportamentale tra individui, di cui bisogna tenere conto quando impiegati come animali di controllo. Per cui, nell'ambito della scelta di questa specie, è stato ipotizzato di verificare anche se il comportamento di animali *wild-type* di due linee differenti sia influenzato dal regime termico imposto.

1.7 La scelta dei test comportamentali

Dicentrarchus labrax. Per questa specie si sono scelti dei test comportamentali che fossero maggiormente adatti ad analizzare gli aspetti fondamentali per la sua sopravvivenza. In particolare, si sono voluti studiare i comportamenti associati ad un contesto di foraggiamento, di risposta ad un disturbo esterno e sociale. Quindi, prendere in considerazione questi test, ci permette di fare delle ipotesi inerenti la capacità delle spigole di tollerare e far fronte a simili cambiamenti ambientali, in un contesto in cui la temperatura dell'habitat non sia più conforme alle loro esigenze.

In un'ottica di benessere animale alcune variazioni nei comportamenti scelti, tipo assenza di consumo di cibo, maggiore aggressività o incapacità di attuare un'idonea risposta ad uno stimolo avverso, possono rappresentare anche dei possibili indicatori da monitorare per assicurare un adeguato livello di salute degli animali nelle produzioni commerciali.

Danio rerio. Essendo questo pesce particolarmente importante per la ricerca scientifica, si sono scelti dei test comportamentali che già sono frequentemente impiegati in letteratura. In particolare sono stati impiegati due test usati per gli studi di ansia e due test usati per analizzare il comportamento sociale del danio zebrato. Questo ci permette di fare delle ipotesi su come la temperatura va ad influire sui principali paradigmi comportamentali sviluppati per questo animale e ci permette anche di valutare l'impiego delle variazioni della temperatura di allevamento come possibile fattore stressante da replicare nei laboratori.

La scelta di due test impiegati per valutare l'ansia di questo pesce e due test per valutare la risposta sociale, ci permette anche di verificare quali componenti del bagaglio comportamentale del danio zebrato vengono influenzate dalle variazioni della temperatura o se una componente in particolare viene modificata più velocemente e in modo più cospicuo dal trattamento termico. In questo modo si possono fare delle ipotesi su quali fattori andare a monitorare più attentamente in uno studio inerente le risposte comportamentali del pesce zebra ad uno stress ambientale prolungato nel tempo.

1.8 Durata del trattamento termico

Un'importante caratteristica che identifica lo stress è la durata di questo. Alcuni autori definiscono uno stress acuto quando questo dura per un intervallo di tempo che va da qualche minuto a qualche ora, uno stress cronico quando questo dura per giorni o mesi (Dhabhar, 2000).

Dalla letteratura sullo stress dei pesci, appare chiaro che gran parte degli autori applicano la stessa definizione di stress acuto e cronico, poichè la cattura attraverso reti oppure la manipolazione degli animali negli allevamenti vengono indicati come stress acuti (Barreto e Volpato, 2004; McCormick *et al.*, 1998), mentre il sovraffollamento degli allevamenti intensivi e il conseguente inquinamento delle acque, vengono intesi come stress cronici (Barcellos *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2010; Wendelaar Bonga, 1997).

In questo studio abbiamo analizzato il comportamento degli animali dopo un'acclimatazione prolungata a differenti regimi termici.

Dicentrarchus labrax. Come precedentemente spiegato (paragrafo 1.6) questa specie è stata scelta poichè nelle zone del Mediterraneo il suo allevamento è una pratica molto comune; quindi, si è ipotizzato che studiare l'effetto di un trattamento termico di lunga durata avrebbe fornito maggiori

informazioni su quali parametri comportamentali possono esser presi in considerazione per monitorare queste popolazioni.

Danio rerio. Come precedentemente spiegato (paragrafo 1.6) questa specie è stata scelta poichè sempre più diffusa nei laboratori di ricerca come animale modello di numerosissime patologie umane, anche legate all'uso di farmaci che alterano il comportamento. Partendo dall'ipotesi di utilizzare la temperatura come possibile fattore di stress, si è scelto di studiare le influenze del trattamento termico sul comportamento di questo pesce in due periodi differenti, uno di breve e uno di lunga durata, per avere maggiori informazioni sulla tipologia di adattamento e il tipo di risposta che gli animali attuano al fine di adattarsi a simili condizioni ambientali.

1.9 Scopo del lavoro

L'idea alla base di questo lavoro è che la condizione termica possa avere un'influenza sul comportamento dei pesci. Le specie utilizzate per questo studio sono state due, la spigola e il pesce zebra.

Per la spigola si è partiti dall'ipotesi che regimi termici inappropriati potessero compromettere la capacità di risposta agli stimoli esterni dell'animale, andando quindi a minacciare la capacità di sopravvivenza di questo pesce. Quindi, gli obiettivi che sono stati presi in considerazione sono stati:

- Valutare quali tratti comportamentali sono maggiormente influenzati dalle variazioni di temperatura
- Valutare se uno i regimi termici scelti può rappresentare uno stress, al punto da modificare attività fondamentali per la sopravvivenza di questo animale, quali il foraggiamento o la risposta ad uno stimolo avverso

Per il pesce zebra si è partiti dall'ipotesi che un regime termico inappropriato potesse essere utilizzato come fattore di stress negli studi che riguardano l'uso di farmaci antidepressivi o le sostanze ansiolitiche. Quindi, gli obiettivi che sono stati presi in considerazione sono stati:

- Valutare quali tratti comportamentali sono maggiormente influenzati dalle variazioni di temperatura
- Valutare se uno i regimi termici scelti può rappresentare uno stress per questi pesci
- Valutare come si modifica il comportamento a seconda della durata del regime termico imposto

- Valutare se la temperatura imposta modifica il comportamento di pesci *wild-type* di linee differenti

I risultati di questo lavoro saranno potenzialmente importanti per comprendere se le variazioni di temperatura influiscono sul comportamento di queste due specie di pesci, una fondamentale per l'economia dei paesi del Mediterraneo, l'altra per l'impiego che se ne fa nella ricerca scientifica.

2 MATERIALI E METODI

2.1 *Dicentrarchus labrax*

2.1.1 Stabulazione spigola

Un totale di 216 giovani spigole sono state prelevate in tre differenti riprese (marzo, luglio e novembre 2012) in una azienda di acquacoltura di Brindisi (Panittica Pugliese s.r.l., Italia). Ogni prelievo è consistito nella presa di 72 pesci.

Le informazioni ottenute dall'allevamento sulle dimensioni degli animali prelevati (10 cm di lunghezza) ci hanno permesso di collocare questi animali nella fascia d'età "giovanile" (circa due anni di età: Giffard-Mena *et al.*, 2011).

Gli animali sono stati trasferiti all'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Reparto di Neuroscienze comportamentali, Roma (Italia). Al loro arrivo gli animali sono stati suddivisi in sei gruppi da 12 individui ciascuno ed alloggiati in vasche da 180L (100 x 40 x 50 cm, lunghezza x ampiezza x altezza), munite di filtri interni (ricircolo di 300L/h) e ossigenatori con porose. Per replicare le condizioni dell'allevamento, in una fase iniziale le vasche sono state tenute a 19°C attraverso l'uso di termostati elettronici a colonna (Eden 430el) inseriti negli acquari, con salinità dell'acqua di 15 ± 1 ‰.

Durante il mese di quarantena è stato somministrato agli animali un agente disinfettante (Oidimol Dajana Pet, Brno, Czech Republic; somministrato ad una concentrazione di 0.2 ml/L, come da indicazione del prodotto) per l'eliminazione di parassiti della pelle, tipici patogeni infestanti negli allevamenti commerciali. Inoltre, sulla base della letteratura, durante questo periodo è stata gradualmente diminuita la salinità dell'acqua per diminuire il rischio di infezioni patologiche, fino ad arrivare al 5 ± 2 ‰ (Chang e Plumb, 1996).

Per assicurare agli animali un fotoperiodo adeguato è stato impostato un ciclo luce:buio di 12:12 ore attraverso l'uso di timer nella stanza in cui erano alloggiate le vasche.

Gli animali sono stati alimentati con *pellets* commerciali (Aqualim, France). Venivano distribuiti tre pasti giornalieri e si continuava a somministrare cibo fin quando non veniva lasciato un avanzo sul fondo della vasca per più di cinque minuti. A quel punto si procedeva alla rimozione del cibo avanzato mediante sifonatura. Per assicurare un'adeguata qualità dell'acqua tre volte a settimana si procedeva al monitoraggio della salinità, della concentrazione dello ione ammonio e dei nitriti e nitrati; una volta a settimana si procedeva al parziale cambio d'acqua per rimuovere i residui organici dagli acquari. Durante le operazioni di pulizia degli acquari veniva sostituito non più del

30% del volume di acqua, per non andare ad intaccare la colonia di batteri presenti nella vasca. Durante i tre periodi di quarantena (marzo, luglio e novembre 2012) sono morti un totale di 43 pesci, probabilmente a causa di infezioni dovute a parassiti della pelle. Quindi, in media durante le quarantene si sono registrate circa due o tre morti in ognuna delle sei vasche di mantenimento in uso. Invece, nei periodi sperimentali (durante il trattamento termico) sono state registrate solo due morti considerando tutte e tre le replicate.

2.1.2 Trattamento spigola

Le tre temperature sperimentali utilizzate in questo studio sono state scelte in base all'intervallo termico considerato ottimale per la crescita della spigola (21-25°C: Barnabé, 1991). Le tre temperature sono state selezionate tre gradi sotto (18°C), all'interno (22°C) e tre gradi sopra (28°C) di detto intervallo. Le tre condizioni termiche sono state raggiunte modificando gradualmente la temperatura nelle vasche di mantenimento di un grado al giorno partendo dall'iniziale temperatura di 19°C. Pertanto, la vasca a 18°C è stata portata alla temperatura sperimentale ipotermica in un giorno, la vasca a 22°C è stata portata alla temperatura sperimentale intermedia in tre giorni, la vasca a 28°C è stata portata alla temperatura sperimentale ipertermica in nove giorni. Per raggiungere la temperatura di 18°C sono stati utilizzati dei refrigeratori (TK500) collegati a delle pompe poste nelle vasche delle spigole, per raggiungere la temperatura di 22°C e di 28°C sono stati utilizzati termostati elettronici (Eden 430el) inseriti negli acquari. L'ambiente interno delle vasche era identico, per cui tutte le vasche di mantenimento a temperatura avevano all'interno lo stesso numero di termostati e pompe, anche se il loro uso non era necessario. Il periodo sperimentale aveva inizio quando le tre temperature sperimentali sono state raggiunte. Il trattamento termico è stato applicato per 21 giorni. Questo intervallo di tempo è stato scelto sulla base della letteratura, che indica 20 giorni come il tempo necessario agli organismi ectotermici per acclimatarsi ad un cambiamento estremo (Lutterschmidt e Hutchinson, 1997; Schaefer e Ryan, 2006). In ogni sessione sperimentale (marzo, luglio e novembre 2012), si avevano due vasche per ogni temperatura sperimentale (due acquari rispettivamente a 18, 22 e 28°C), per cui nel totale delle tre replicate, si sono avute sei vasche di mantenimento per ognuno dei tre trattamenti termici. In ogni sessione sperimentale sono state testate tutte e tre le temperature per evitare che qualche fattore esterno (dovuto alla stagione o al particolare gruppo di pesci prelevato dall'allevamento) potesse influire sulla risposta delle spigole al trattamento termico.

La fine dei 21 giorni per le tre temperature sperimentali veniva raggiunta in periodi sfalsati di modo da avere una settimana per eseguire i test comportamentali prima che un'altra temperatura

sperimentale avesse raggiunto il termine del trattamento termico. Nel periodo di trattamento termico si procedeva alla misurazione della temperatura due volte al giorno (10.00 e 17.00) e si registravano eventuali fluttuazioni; saltuariamente si è osservata una variazione di $\pm 1^{\circ}\text{C}$ dal valore desiderato.

Per evitare il contatto visivo tra i pesci appartenenti alle sei diverse vasche di mantenimento sono stati posizionati tra di esse dei pannelli coprenti.

In uno studio pilota precedentemente effettuato era stato osservato che spesso le spigole isolate restavano inattive per gran parte del tempo dei test comportamentali, mentre se mantenute in coppia mostravano un comportamento di nuoto normale. Pertanto, al fine di ridurre l'inattività degli animali dovuta allo stress da isolamento, è stato deciso di svolgere i test comportamentali con una coppia di spigole per volta, invece che con un singolo animale. Per evitare un effetto di trascinamento tra i due soggetti che partecipavano alla prova comportamentale, in sede di analisi del comportamento, si è deciso di considerare solo un animale registrando quindi il comportamento di un solo membro della coppia.

Al termine dei 21 giorni di temperature sperimentali si effettuavano quattro test comportamentali: il test di foraggiamento, il test olfattivo, il *mirror test* e il test avversivo. Per ogni temperatura si sono testate un numero di coppie pari a 25 (50 animali in totale per ogni temperatura), quindi la dimensione del campione intra-temperatura è stata di 25 soggetti sperimentali.

Una volta che la coppia sperimentale aveva concluso la batteria di quattro test, veniva spostata in una vasca uguale a quella di mantenimento in dimensioni, aspetto e caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua (in seguito definite "vasche finali"). In questo modo si evitava la ricattura di una stessa coppia di individui per i test comportamentali.

Gli ultimi soggetti sperimentali pescati dalle vasche di mantenimento a temperatura avevano una condizione sociale simile a quella dei primi soggetti sperimentali catturati. Infatti, è stato adottato un disegno sperimentale tale per cui tutti i pesci impiegati nei test comportamentali avessero sempre un gruppo sociale con cui stare, questo affinché la condizione di isolamento sociale, di per sé stressante, non influenzasse il loro comportamento. Nello specifico l'ultimo giorno di test venivano pescati contemporaneamente quattro animali a comporre due coppie da testare, lasciando almeno un altro animale in vasca che non veniva impiegato nei test comportamentali. Questo soggetto, appena allontanate le ultime due coppie sperimentali, veniva catturato e messo nelle vasche finali affinché non subisse uno stress da isolamento sociale.

Terminata la fase delle prove comportamentali, gli animali venivano lasciati nella vasca finale in modo da diminuire eventuali effetti stressanti derivati dalla cattura necessaria per effettuare i test

comportamentali. In seguito il gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Charles Darwin” dell’Università Sapienza di Roma ha effettuato la cattura random di 38 soggetti nelle diverse sessioni sperimentali (rispettivamente 14, 12, 12 per i 18, i 26 e i 28°C) per procedere al sacrificio necessario alla conduzione delle analisi neurochimiche. L’eutanasia era provocata attraverso l’immersione in un eccesso di feniletanolo (8 ml/L). Le restanti spigole sono state trasferite in acquari a 19°C e impiegate per altri studi. Prima di procedere all’eutanasia, i 38 soggetti sono stati pesati.

Tutte le procedure di mantenimento e quelle sperimentali sono state eseguite nel rispetto sia dei requisiti per la cura e la sistemazione degli animali (allegato III, sezione B della Direttiva 2010/63/EU) che delle linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (Raccomandazione 2007/526/EC).

2.1.3 Test comportamentali spigola

Il comportamento dei pesci è stato videoregistrato durante sessioni sperimentali che si svolgevano in una fascia oraria compresa tra le 10.00 e le 14.00. In questo periodo è stata condotta una batteria di test comportamentali (quattro) eseguiti uno di seguito all’altro. Lo svolgimento di questi test ha previsto la separazione della coppia sperimentale dal resto del gruppo ed il suo inserimento in vasche (da qui chiamate “vasche sperimentali”) da 45L (50 x 30 x 30 cm, lunghezza x altezza x ampiezza) ognuna munita di un ossigenatore con porosa ed un termostato. Le videoregistrazioni sono avvenute mediante una videocamera Sanyo (VPC-GH1, Vietnam), posta frontalmente a circa 50 cm dalle vasche sperimentali; in questo modo è stato possibile avere una completa inquadratura dell’acquario.

La coppia sperimentale veniva catturata con un retino e posta nella vasca sperimentale 24 ore prima dell’inizio dei test comportamentali così che potesse familiarizzare con l’ambiente nuovo; inoltre, in questo modo si evitava che lo stress legato alla cattura influenzasse il comportamento.

Videocamera e treppiedi erano posizionati davanti alle vasche per far familiarizzare i pesci con la struttura necessaria alle videoriprese. La videocamera era attivata due minuti prima dell’inizio dei test comportamentali in modo da arrecare il minor disturbo possibile agli animali.

Poiché gli animali venivano spostati nella vasca sperimentale il giorno prima dei test, queste erano munite di termostati e pompe collegate ai refrigeratori (per mantenere l’acqua alle tre differenti temperature sperimentali) e di ossigenatori con porosa (per far in modo che la coppia sperimentale non dovesse subire nessun tipo di stress fisico dovuto a modifiche dei parametri chimico-fisici dell’acqua).

Vista la natura estremamente schiva della spigola e visto che il loro trasferimento nella vasca sperimentale avveniva il giorno prima degli esperimenti, è stato deciso di dotare la vasca sperimentale di un rifugio che veniva rimosso molto delicatamente due ore prima dell'inizio dei test comportamentali.

Tutti i test fatti agli animali sono stati condotti in una stanza vuota e con pareti chiare, per ridurre gli stimoli visivi esterni che avrebbero potuto distrarre i soggetti testati dagli stimoli sperimentali che gli venivano presentati. L'acqua nelle vasche sperimentali aveva la stessa temperatura e la stessa composizione chimica delle vasche di mantenimento. La condizione termica dell'acqua veniva sistematicamente controllata al termine di ogni prova.

I quattro test venivano eseguiti nella stessa vasca sperimentale (53.5 x 40.0 x 36.5 cm lunghezza x ampiezza x altezza) uno di seguito all'altro, con un intervallo di 30 minuti tra un test e il seguente, poiché in uno studio pilota era stato osservato che questo fosse il periodo appropriato affinché il pesce tornasse ad una attività di nuoto normale. Con l'impiego di due telecamere e di due treppiedi giornalmente venivano registrate le prove comportamentali di due coppie di spigole. Poiché la spigola è un animale che può reagire alla presenza delle persone attuando comportamenti difensivi (per esempio, nascondersi, stare immobile sul fondo della vasca o nuotare velocemente), sono stati usati dei pannelli coprenti che permettevano di azionare le telecamere e di introdurre negli acquari gli oggetti usati nei test senza disturbare gli animali. Al fine di amplificare la risposta degli animali al cibo presentato in due test comportamentali (test di foraggiamento e test olfattivo) le coppie di pesci isolate venivano tenute a digiuno dal momento della loro cattura dalla vasca di mantenimento per esser collocate nella vasca sperimentale.

Data la natura delle prove comportamentali scelte per le spigole era ipotizzabile un effetto di trascinamento di un test sul successivo, cioè che il comportamento di un soggetto in un test potesse essere in parte influenzato da quanto avvenuto nel test precedente. Pertanto, si è deciso di mantenere lo stesso ordine delle prove al fine di mantenere costante l'interferenza tra di essi. Si è scelto di presentare come primi test quelli riguardanti l'alimentazione e come ultimo test quello che prevedeva l'inserimento in vasca di un disturbo e una loro reazione di fuga. Questa scelta si è basata sulla letteratura scientifica che evidenzia come le spigole possono smettere di alimentarsi per reazione ad un disturbo (Pickett e Pawson, 1994). L'ordine scelto è stato: i) test di foraggiamento, ii) test olfattivo; iii) *mirror test* e iv) test avversivo.

Test di foraggiamento. Lo scopo del test era quello di verificare un'eventuale influenza della temperatura sul comportamento alimentare delle giovani spigole. A tale scopo sono state utilizzate

larve di zanzara rossa congelate (*Chironomus salinarius*) di lunghezza media di 1 cm, facilmente reperibili nei negozi di acquariofilia poiché frequentemente impiegate come arricchimento alimentare per pesci. Poiché la conoscenza della preda è uno dei fattori fondamentali nel comportamento alimentare di alcune specie di pesci (Brown *et al.*, 2003), si è deciso di far familiarizzare le spigole con la preda scelta; quindi, durante i 21 giorni di trattamento termico, settimanalmente venivano date come alimento le larve di zanzara rosse. Il test di foraggiamento durava cinque minuti e aveva inizio quando venivano rilasciate circa 30 larve di zanzara rossa attraverso una siringa (priva di ago) ad una estremità della vasca sperimentale (Fig. 2.1). La posizione di rilascio delle zanzare (presentate sul lato destro o sinistro della vasca sperimentale) è stata bilanciata tra le prove. Per dare inizio al test si aspettava che le spigole avessero un'attività di nuoto normale per circa cinque minuti.

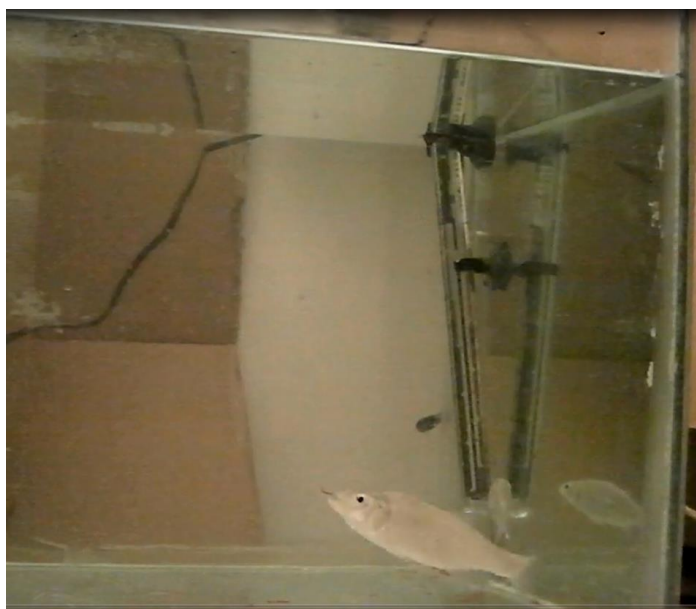


Fig. 2.1. Test di foraggiamento

Test olfattivo. I pesci utilizzano l'olfatto per l'individuazione, il riconoscimento e la selezione del cibo (Atema, 1980; Hara, 1993). In particolare diversi studi supportano il ruolo dell'olfatto come senso fondamentale per il foraggiamento nelle spigole, poiché attraverso l'aggiunta alla dieta di miscele appetibili (per esempio, aggiunta di tessuto di calamari) aumenta l'assunzione del cibo, la crescita corporea e l'utilizzo delle proteine di questi animali (Mackie e Mitchell, 1982; Dias *et al.*, 1997).

Per questo test sono state scelte come stimolo olfattivo larve di *Sarcophaga carnaria* (comunemente detto bigattino), usate come esche vive nell'hobby della pesca. Queste esche

venivano proposte ai pesci all'interno di un infusore da te di metallo in cui erano inseriti 10 bigattini e che veniva adagiato ad un lato della vasca comportamentale, a metà della colonna d'acqua (Fig. 2.2). Nelle tre settimane di trattamento termico venivano presentati una volta a settimana gli infusori da te sia vuoti che con le larve al loro interno. Così le spigole potevano familiarizzare con questo oggetto prima dello svolgimento della prova comportamentale. Poiché il bigattino produce ammoniaca come sostanza di scarto si procedeva ad un lavaggio in acqua delle larve nell'ora che precedeva il test. Si aspettava che le spigole avessero cinque minuti di nuoto normale prima di procedere all'inserimento dello stimolo olfattivo nella vasca sperimentale. La posizione dello stimolo olfattivo (presentato sul lato destro o sinistro della vasca sperimentale) è stata bilanciata tra le prove. Per evitare che le giovani spigole fossero maggiormente interessate allo stimolo olfattivo a causa del precedente test di foraggiamento, i due stimoli non si sono presentati nella stessa parte della vasca, quindi quando una coppia di animali aveva il rilascio delle larve (nel test di foraggiamento) nella parte destra della vasca sperimentale, lo stimolo olfattivo veniva loro presentato nella parte sinistra. Il test olfattivo durava dieci minuti.



Fig. 2.2. Test olfattivo

Mirror test. In letteratura è noto che lo stimolo dello specchio è utilizzato sia per studiare la risposta sociale dei pesci allo stimolo del riflesso, sia per studiare la valutazione del predatore (Meliska *et al.*, 1980; Miklosi *et al.*, 1997; Milinski, 1987). Inoltre, in alcuni studi è emerso che alcuni pesci mostrano una preferenza nell'uso di un occhio con cui ispezionare il proprio riflesso e questa lateralizzazione influenza il loro comportamento (Tsubokawa *et al.*, 2009).

In questo test si è voluto studiare se la risposta delle spigole al proprio riflesso nello specchio potesse subire qualche modifica in base alla temperatura di mantenimento. Uno specchio (24 x 18 cm) era delicatamente posto al di fuori dalla vasca sperimentale su uno dei lati corti (40 cm) (Fig. 2.3). La posizione dello specchio (presentato sul lato destro o sinistro della vasca sperimentale) è stata bilanciata tra le prove. Il test durava cinque minuti.



Fig. 2.3. *Mirror test*

Il test avversivo. Lo scopo di questa prova era quello di riprodurre il movimento e/o la vibrazione dell'acqua in seguito all'entrata in acqua di un elemento potenzialmente pericoloso, tipo una rete da pesca o un predatore aereo, per studiare come le temperature influenzino la risposta ad un disturbo. È stato scelto come stimolo una fascia di plastica del diametro di 8 cm che veniva lasciata cadere da una piattaforma posta a 0.5 m al di sopra della vasca sperimentale. Prima di lasciar cadere l'oggetto si aspettava che le spigole si trovassero sotto la piattaforma (Fig. 2.4). Il comportamento dei pesci è stato registrato per 10 minuti dopo l'esecuzione dello stimolo avverso.



Fig. 2.4. Test avversivo

2.1.4 Etogramma spigola

Esistono pochi studi condotti sul comportamento delle spigole in natura; la maggior parte dei lavori inerenti il comportamento di questo animale sono stati fatti in cattività e riguardano principalmente aspetti importanti per l'allevamento, come il comportamento di foraggiamento o l'attività motoria (Georgalas *et al.*, 2007; Lefrancois e Dominici, 2006).

Anche la risposta antipredatoria della spigola è stata studiata, soprattutto in relazione a fattori ambientali stressanti per gli animali, come stati di ipossia o cambiamenti climatici (Lefrancois e Dominici, 2006; Malavasi *et al.*, 2013).

A causa della mancanza in letteratura di un etogramma da applicare a questa specie, in questo studio si è usata come guida il libro di Pickett e Pawson (1994), il quale nasce come libro di biologia ed ecologia, conservazione ed allevamento della spigola. In un capitolo sono dettagliatamente descritti alcuni comportamenti che sono stati in seguito osservati nel corso delle prove comportamentali qui eseguite.

In questo studio sono state rilevate categorie comportamentali differenti a seconda del test eseguito.

Test di foraggiamento:

- *first biting*, tempo trascorso tra il rilascio delle prede in vasca e l'attuazione della prima predazione da parte del soggetto sperimentale
- *feeding*, definito come il catturare e/o mangiare la preda in seguito a movimenti rapidi e con frequenti cambi di direzione

- *fast swimming*, movimenti rapidi e con frequenti cambiamenti di direzione (definiti *darting movements*)
- *fin raising*, innalzamenti e abbassamenti rapidi e ripetuti delle pinne dorsali

Questi comportamenti sono indicatori dell'interesse degli animali verso la preda, mostrabile sia attraverso un semplice stato di eccitazione (visibile dai movimenti della pinna dorsale e dal nuoto veloce) sia attraverso la predazione vera e propria.

Test olfattivo:

- *swimming close to the cue*, definito come la presenza del pesce in vicinanza dello stimolo olfattivo
- *contact with the cue*, toccare lo stimolo olfattivo con la bocca o urtarlo con il corpo
- *fin raising*, innalzamenti e abbassamenti rapidi e ripetuti delle pinne dorsali

La misurazione di questi comportamenti permette di mettere in evidenza l'interesse degli animali verso lo stimolo olfattivo, evidenziabile sia attraverso l'espressione di un semplice stato di eccitazione (visibile dai movimenti della pinna dorsale), sia attraverso un differente modo di interagire con lo stimolo (avvicinandosi alla zona dove era presente lo stimolo o entrando in contatto con esso).

Mirror test:

- *latency to the contact with the mirror*, valutata come tempo trascorso tra la presentazione dello specchio e il primo contatto con questo
- *contact with the mirror*, definito come il toccare con la bocca o con il corpo lo specchio
- *C-start right reaction/ C-start left reaction*, definito come una flessione del corpo verso destra/sinistra a formare una C quando di fronte allo specchio
- *arousal*, innalzamenti e abbassamenti rapidi e ripetuti delle pinne dorsali associati con un nuoto a zig-zag e/o apertura ripetuta della bocca, in prossimità dello specchio

Questi comportamenti mettono in evidenza un differente interesse degli animali verso lo specchio e verso la propria immagine riflessa, esprimibile sia attraverso un semplice stato di eccitazione (visibile dai diversi movimenti del corpo) sia attraverso un'interazione con lo stimolo (avvicinandosi alla parete dove era presente lo specchio o entrando in contatto con essa).

Test avversivo:

- *escape response*, definita come il tempo trascorso tra la caduta dell'oggetto e la fuga attraverso movimenti rapidi e con frequenti cambi di direzione
- *swimming close to the object*, definito come la presenza del pesce nelle vicinanze dell'oggetto
- *contact with the object*, toccare l'oggetto con la bocca o con il lato del corpo
- *inactivity*, assenza di nuoto in galleggiamento lungo la colonna d'acqua, con leggeri movimenti delle pinne pettorali
- *freezing*, totale assenza di movimento e posizionamento sul fondo della vasca

L'espressione di questi comportamenti fornisce un'indicazione sia di una reazione di paura degli animali (la latenza alla fuga o il nuoto veloce e l'immobilità indici di uno stato di malessere) che di un interesse degli animali verso l'oggetto introdotto in vasca (attraverso un avvicinarsi o toccare l'oggetto).

2.1.5 Analisi dei filmati spigola

Parte dei filmati sono stati sbobinati ed elaborati nei mesi che seguivano la singola replicata, il resto a partire dal mese di gennaio 2013 mediante l'utilizzo del software Observer XT 10.5 della Noldus. Anche se i test comportamentali sono stati condotti su coppie di spigole, l'analisi del comportamento è stata condotta su un solo soggetto sperimentale. Questo per evitare un effetto di trascinamento tra i due soggetti che partecipavano alla prova comportamentale. È stato definito "soggetto sperimentale" il primo animale che si muoveva all'interno della vasca durante le videoregistrazioni. Sono stati utilizzati piccoli dettagli fisici (le dimensioni del pesce, colore e forma della pinna caudale, differenze nella colorazione del corpo) per riconoscere il soggetto sperimentale dal conspecifico. Per ogni soggetto sperimentale nelle differenti prove, sono stati registrati la durata e la frequenza di diversi comportamenti.

I comportamenti analizzati (descritti precedentemente nel paragrafo 2.1.4) sono diversi a seconda della prova e sono stati scelti sulla base della letteratura disponibile sul comportamento della spigola (Pickett e Pawson, 1994) e in seguito ad uno studio pilota condotto sulle stesse prove comportamentali.

Test di foraggiamento. I comportamenti analizzati sono stati i seguenti: *first biting* (latenza alla prima predazione), *feeding* (frequenze degli atti di predazione), *fin raising* (frequenza degli innalzamenti delle pinne dorsali), *fast swimming* (durata e frequenza dei *darting movements*).

Test olfattivo. I comportamenti analizzati sono stati i seguenti: *swimming close to the cue* (definito come la presenza del pesce, in durata e frequenza, in un'area di 8 cm² disegnata su un foglio trasparente attaccato al video in riproduzione con al centro lo stimolo olfattivo); *contact with the cue* (durata e frequenza), *fin raising* (frequenza degli innalzamenti delle pinne dorsali).

Mirror test. I comportamenti analizzati sono stati i seguenti: *latency to the contact with the mirror* (latenza al primo contatto con lo specchio), *contact with the mirror* (durata e frequenza), *C-start right reaction* e *C-start left reaction* (frequenza e durata delle flessioni), *arousal* (durata di questi comportamenti entro 2 cm dal vetro della vasca dove era poggiato lo specchio).

Test avversivo. I comportamenti analizzati sono stati i seguenti: *escape response* (registrata subito dopo la caduta dell'oggetto), *swimming close to the object* (frequenza e durata della presenza del pesce intorno all'oggetto), *contact with the object* (frequenza e durata), *inactivity* (frequenza e durata), *freezing* (frequenza e durata). Tutti i comportamenti sono stati registrati all'interno di un'area di 64 cm² con al centro l'oggetto, disegnata su un foglio trasparente attaccato al video in riproduzione.

2.1.6 Analisi statistica spigola

Un totale di 16 variabili sono state considerate nei quattro test comportamentali. Nel test olfattivo due variabili (*swimming close to the cue* e *contact with the cue*) sono state analizzate sia separatamente che insieme e indicate come *interest in the cue*. Nel test avversivo due variabili (*swimming close to the object* e *contact with the object*) sono state analizzate sia separatamente che insieme e indicate come *interest in the object*. L'elaborazione statistica è stata effettuata attraverso l'impiego del software Statview II (Abacus Concepts). Non sono state condotte delle analisi parametriche poiché i dati non soddisfavano gli assunti di normalità e omoschedasticità. Perciò sono state effettuate delle analisi non parametriche, attraverso il test di Kruskal-Wallis; i post hoc sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney. È stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm per i confronti multipli (Perneger, 1998).

2.2 Danio rerio

2.2.1 Stabulazione dei *wild-type* linea commerciale (primo gruppo)

Nel mese di luglio 2013 sono stati acquistati 65 pesci zebra *wild-type* adulti della linea commerciale da un fornitore autorizzato (Auryfish s.r.l., Bologna, Italia).

Gli animali sono stati trasferiti all'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Reparto di Neuroscienze comportamentali, Roma (Italia). Al loro arrivo gli animali sono stati stabulati insieme, per un periodo di due settimane, in un acquario da 120L (100 x 45 x 40 cm, lunghezza x altezza x ampiezza), munito di filtro esterno (ricircolo 300L/h), ossigenatore con porosa e un termostato per mantenere l'acqua a una temperatura iniziale di 26°C.

Le luci al neon nella stanza dove era alloggiata la vasca erano regolate da un timer al fine di avere un ciclo luce:buio di 14:10 ore. Gli animali sono stati alimentati con mangime in fiocchi JBL Novo Bel (Germania). Venivano distribuiti tre pasti giornalieri e si continuava a somministrare cibo fin quando non veniva lasciato un avanzo sul fondo delle vasche per più di cinque minuti. A quel punto si procedeva alla rimozione del cibo avanzato mediante sifonatura.

Dopo due settimane di acclimatazione al nuovo stabulario, durante le quali si è registrata la morte di due animali, i pesci sono stati suddivisi in tre gruppi da 20 individui ciascuno. Su questi è stato studiato l'effetto dell'esposizione a tre diversi trattamenti termici per un periodo di quattro giorni. Quindi, i tre gruppi sono stati posti ciascuno in una vasca da 45L (50 x 30 x 30 cm, lunghezza x altezza x ampiezza), munita di filtro esterno (ricircolo 300L/h), ossigenatore con porosa e termostato impostato in modo da mantenere la temperatura dell'acqua a 26°C. Il fotoperiodo nella stanza è stato mantenuto uguale a quello impostato all'arrivo dei pesci, tale cioè da avere un ciclo luce:buio di 14:10 ore. Per assicurare un'adeguata qualità dell'acqua una volta a settimana si procedeva al monitoraggio della concentrazione dello ione ammonio e degli ioni nitriti e nitrati e, ogni due settimane, al parziale cambio d'acqua per rimuovere i residui organici dagli acquari. Durante il cambio d'acqua non si cambiava mai più del 30% del volume per non andare ad intaccare la colonia di batteri presenti in vasca.

Tre pesci non sono stati distribuiti nelle vasche a temperatura, ma impiegati come stimolo sociale nel *group preference test*; sono quindi stati messi in una vasca di dimensioni 28 x 25 x 16 cm (lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondente a circa 10L di acqua), munita di ossigenatore con porosa e termostato per mantenere l'acqua a 26°C, privi di filtro (essendo un numero esiguo, il filtro non è stato necessario, si procedeva al cambio del 50% dell'acqua all'occorrenza).

Dopo due settimane di acclimatazione alla vasca da 45L, è iniziata la modifica della condizione termica.

2.2.2 Condizione termica dei *wild-type* linea commerciale (trattamento di breve periodo)

Le temperature sperimentali applicate in questo studio sono state scelte in base all'intervallo che molti autori considerano ottimale per la sopravvivenza del pesce zebra: 22-30°C (Matthews *et al.*,

2002). In questo studio si è deciso di studiare animali mantenuti a 26°C (a metà dell'intervallo sopracitato) e animali mantenuti 8°C al di sopra e 8°C al di sotto di questa temperatura. Di conseguenza le tre temperature studiate sono state: 18°C (condizione ipotermica), 26°C (condizione intermedia), 34°C (condizione ipertermica). Le temperature sperimentali sono state raggiunte in un giorno. Nella vasca a 18°C la temperatura era raggiunta attraverso un refrigeratore (TK 500) posto di fianco alla vasca, ma non visibile dai pesci, collegato ad una pompa inserita nella vasca. Nella vasca a 26°C la temperatura era raggiunta mediante un termostato elettronico a colonna (Eden, 430el) posto all'interno dell'acquario. Nella vasca a 34°C la temperatura era raggiunta attraverso un termostato a cavo riscaldante (Eden, 415) posto sul fondo della vasca. Per rendere identico l'ambiente all'interno dei tre diversi acquari, tutti erano muniti di pompa, termostato elettronico a colonna e termostato a cavo. Si procedeva alla misurazione della temperatura due volte al giorno (10.00 e 17.00) e si registravano eventuali fluttuazioni dai valori desiderati. Per evitare il contatto visivo tra i pesci ospitati nelle diverse vasche di mantenimento sono stati posizionati dei pannelli coprenti tra di esse.

Il trattamento termico di breve periodo durava quattro giorni, il quinto giorno si procedeva allo svolgimento delle prove comportamentali con l'impiego di 10 soggetti sperimentali per ogni temperatura (10 pesci zebra rispettivamente per la vasca a 18, a 26 e a 34°C). I restanti 10 animali lasciati in vasca non venivano testati affinché l'ultimo animale sperimentale avesse altri animali con cui fare banco e quindi non subisse uno stress legato alla privazione sociale.

I giorni di inizio delle tre temperature sperimentali sono stati sfalsati di modo da avere un giorno per l'effettuazione dei test comportamentali.

Gli animali sono stati sottoposti a tre prove comportamentali (*dark/light preference test*, *novel diving tank test* e *group preference test*). Si è deciso di sottoporre gli animali solo a tre prove comportamentali poiché i test dovevano essere effettuati in un'unica giornata per ogni temperatura. Ogni soggetto sperimentale, dopo aver effettuato i tre test comportamentali, veniva posto in una vasca uguale, nelle dimensioni e aspetto, temperatura e chimica dell'acqua, a quella di mantenimento (di seguito definite "vasche finali"). Questa procedura assicurava che non si pescasse due volte lo stesso soggetto per le prove comportamentali. Al termine dei test comportamentali, tutti gli animali (sia i soggetti sperimentali che i pesci usati come banco) venivano pesati e poi rilasciati nelle vasche finali a temperatura, quindi il gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" procedeva al sacrificio di tutti gli animali, attraverso un eccesso di feniletanolo (8 ml/L), per le analisi di natura neurochimiche.

Tutte le procedure di mantenimento e cura degli animali hanno rispettato sia i requisiti per la cura e il mantenimento dei pesci riportati nella Direttiva Europea 2010/63/UE, Allegato III, Sezione B (UE, 2010), sia la Raccomandazione 2007/526/CE sulle linee guida per la cura degli animali impiegati per scopi sperimentali e scientifici (CE, 2007).

2.2.3 Stabulazione dei *wild-type* linea commerciale (secondo gruppo)

Nel mese di settembre 2013 sono stati acquistati 125 pesci zebra *wild-type* adulti della linea commerciale acquistati presso un fornitore autorizzato (Auryfish s.r.l., Bologna, Italia).

Gli animali sono stati trasferiti all'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Reparto di Neuroscienze comportamentali, Roma (Italia). Per un periodo di due settimane i pesci sono stati stabulati insieme in un acquario da 180L (100 x 45 x 40 cm, lunghezza x altezza x ampiezza), munito di filtro esterno (ricircolo 300L/h), ossigenatore con porosa e un termostato per mantenere l'acqua a una temperatura iniziale di 26°C. Le luci al neon nella stanza dove era alloggiata la vasca erano regolate da un timer al fine di avere un ciclo luce:buio di 14:10 ore. Gli animali sono stati alimentati mangime in fiocchi JBL Novo Bel (Germania). Venivano distribuiti tre pasti giornalieri e si continuava a somministrare cibo fin quando non veniva lasciato un avanzo sul fondo delle vasche per più di cinque minuti. A quel punto si procedeva alla rimozione del cibo avanzato mediante sifonatura.

Dopo due settimane di acclimatazione al nuovo stabulario, durante le quali non si è registrata alcuna mortalità, gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi da 40 individui ciascuno su cui condurre lo studio di un trattamento termico sul lungo periodo (21 giorni). Quindi, i tre gruppi sono stati posti ciascuno in tre vasche da 45L (50 x 30 x 30 cm, lunghezza x altezza x ampiezza) ognuna munita di filtro esterno (ricircolo 300L/h), ossigenatore con porosa e termostato impostato per mantenere la temperatura a 26°C. Il fotoperiodo nella stanza è stato mantenuto uguale a quello impostato all'arrivo dei pesci, tale da avere un ciclo luce:buio di 14:10 ore. Per assicurare un'adeguata qualità dell'acqua una volta a settimana si procedeva al monitoraggio della concentrazione dello ione ammonio e degli ioni nitriti e nitrati e, ogni due settimane, al parziale cambio d'acqua per rimuovere i resti organici dagli acquari. Durante il cambio d'acqua non si sostituiva mai più del 30% del volume per non andare ad intaccare la colonia di batteri presenti in vasca.

Cinque pesci non sono stati distribuiti nelle tre vasche a temperatura poiché sono stati impiegati per fungere da gruppo durante il test comportamentale nominato *group preference*; questi soggetti sono quindi stati messi in una vasca di dimensioni 28 x 25 x 16 cm (lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondente a circa 10L di acqua), munita di ossigenatore con porosa e termostato per mantenere

l'acqua a 26°C, privi di filtro (essendo un numero esiguo, il filtro non è stato necessario, si procedeva al cambio del 50% dell'acqua all'occorrenza).

Dopo due settimane di acclimatazione alla vasca da 45L, è iniziata la modifica della condizione termica.

2.2.4 Condizione termica dei *wild-type* linea commerciale (trattamento di lungo periodo)

Le temperature sperimentali usate in questo studio sono le stesse usate per il pesce zebra *wild-type* linea commerciale su cui è stato eseguito lo studio del trattamento termico di breve periodo, quindi 18°C (condizione ipotermica), 26°C (condizione intermedia), 34°C (condizione ipertermica). I pesci sono stati portati a 18°C e a 34°C (26°C di partenza) in una sola giornata. Si procedeva alla misurazione della temperatura due volte al giorno (10.00 e 17.00) e si registravano eventuali fluttuazioni dei valori; saltuariamente sono state osservate variazioni di $\pm 1^\circ\text{C}$. Per evitare il contatto visivo tra i pesci mantenuti nelle diverse vasche di mantenimento sono stati posizionati dei pannelli coprenti tra di esse.

Il trattamento di lungo periodo dei pesci zebra *wild-type* linea commerciale è durato 21 giorni, al termine dei quali si conducevano quattro test comportamentali (*dark/light preference test*, *novel diving tank test*, *group preference test* e *mirror test*). Questo intervallo di tempo è stato scelto sulla base della letteratura, che indica 20 giorni come il tempo necessario agli organismi ectotermici per acclimatarsi ad un cambiamento estremo (Lutterschmidt e Hutchinson, 1997; Schaefer e Ryan, 2006). Durante i 21 giorni di trattamento termico sono morti 4 pesci nella vasca tenuta a 26°C. Per ogni condizione termica sperimentale (18, 26 e 34°C) si è deciso di testare 25 animali, di modo da lasciare dagli 11 (nella vasca mantenuta alla temperatura intermedia) ai 15 animali (nelle vasche mantenute a 18 e 34°C) a fare da banco nelle vasche di mantenimento. Questa procedura è stata adottata per far sì che la condizione sociale dei soggetti sperimentali catturati per le prove comportamentali fosse identica. Una volta che il soggetto sperimentale aveva concluso la batteria di quattro prove, veniva spostato in un acquario uguale, nelle dimensioni e aspetto, temperatura e chimica dell'acqua, a quello di mantenimento (in seguito definito "vasca finale"). In questo modo non si correva il rischio di catturare un soggetto che aveva già effettuato i test comportamentali. Gli animali sono stati alimentati con mangime in fiocchi JBL Novo Bel (Germania), con la stessa procedura descritta precedentemente nel paragrafo 2.2.3.

Terminata la fase delle osservazioni comportamentali tutti gli animali (i pesci tenuti a fare da banco e i soggetti sperimentali) venivano pesati e rilasciati nella vasca finale a temperatura. Di seguito il gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" procedeva al

sacrificio di tutti gli animali nella vasca, attraverso un eccesso di feniletanolo (8 ml/L), per le analisi di natura neurochimiche. Gli animali usati per fare da stimolo sociale nel *group preference test* sono stati messi insieme e impiegati per altri studi.

Tutte le procedure di mantenimento e cura degli animali hanno rispettato sia i requisiti per la cura e il mantenimento dei pesci riportati nella Direttiva Europea 2010/63/UE, Allegato III, Sezione B (UE, 2010), sia la Raccomandazione 2007/526/CE sulle linee guida per la cura degli animali impiegati per scopi sperimentali e scientifici (CE, 2007).

2.2.5 Stabulazione dei *wild-type* linea AB

All'inizio del mese di luglio 2014 sono stati messi a disposizione 69 pesci zebra *wild-type* adulti linea AB dall'Università di Copenhagen, *Department of Veterinary Disease Biology, Laboratory of Aquatic Pathobiology*.

I pesci provenivano da un sistema di allevamento ad armadio (Aquaschwarz, V30), munito di due pompe e di un sistema automatizzato per regolare il pH (7,4) e la conducibilità dell'acqua (540 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Il sistema era mantenuto a 28°C e il ciclo luce:buio di 14:10 ore era assicurato attraverso un timer impostato nella stanza.

Sono stati formati tre gruppi da 22 individui ciascuno e posti in tre differenti vasche da 45L ognuna (50 x 30 x 30 cm, lunghezza x altezza x ampiezza).

Gli animali sono stati alimentati con cibo secco per adulti ZM-300 (ZM *systems* UK). Venivano distribuiti tre pasti giornalieri e si continuava a somministrare cibo fin quando non veniva lasciato un avanzo sul fondo delle vasche per più di cinque minuti. A quel punto si procedeva alla rimozione del cibo avanzato mediante sifonatura.

Ogni vasca di mantenimento a temperatura era munita di filtro interno (ricircolo 300L/h), ossigenatore con porosa e un termostato, per mantenere l'acqua ad una iniziale temperatura di 26°C \pm 1. Il fotoperiodo nella stanza in cui erano alloggiate le vasche di mantenimento a temperatura era tale da assicurare un ciclo luce:buio di 14:10 ore. Per assicurare un'adeguata qualità dell'acqua una volta a settimana si procedeva alla valutazione dei suoi parametri chimico-fisici con il monitoraggio della concentrazione dello ione ammonio e degli ioni nitriti e nitrati. Inoltre, ogni due settimane, si procedeva al cambio d'acqua per rimuovere i resti organici dagli acquari durante il quale non si cambiava mai più del 30% del volume di acqua per non andare ad intaccare la colonia di batteri presenti nell'acqua.

I tre pesci rimanenti sono stati posti in una vasca di dimensioni minori (28 x 25 x 16 cm, lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondente a circa 10L di acqua), fornita di ossigenatore con porosa e

termostato per mantenere l'acqua a 26°C, privi di filtro dato il numero esiguo di animali. Questi tre soggetti sono stati utilizzati come stimolo sociale nel test comportamentale nominato *group preference*.

Dopo due settimane di acclimatazione al nuovo ambiente è iniziata la procedura sperimentale.

2.2.6 Condizione termica dei *wild-type* linea AB (trattamento di lungo periodo)

Le temperature sperimentali applicate in questo studio sono le stesse cui sono stati sottoposti i pesci zebra *wild-type* linea commerciale negli studi sul trattamento termico di breve e lungo periodo descritti precedentemente (paragrafi 2.2.2 e 2.2.4). Quindi, le tre temperature studiate sono state: 18°C (condizione ipotermica), 26°C (condizione intermedia), 34°C (condizione ipertermica). Le temperature sperimentali sono state raggiunte in un giorno. Nella vasca a 18°C la temperatura era raggiunta attraverso un refrigeratore (TK 500) posto di fianco alla vasca, ma non visibile dai pesci, collegato ad una pompa inserita nella vasca. Nella vasca a 26°C la temperatura era raggiunta mediante un termostato elettronico a colonna (Eden, 430el) posto all'interno dell'acquario. Nella vasca a 34°C la temperatura era raggiunta attraverso un termostato a cavo riscaldante (Eden, 415) posto sul fondo della vasca. Per rendere identico l'ambiente all'interno dei tre diversi acquari, tutti erano muniti di pompa, termostato elettronico a colonna e termostato a cavo.

Gli animali sono stati utilizzati per lo studio delle modifiche comportamentali a seguito di un trattamento termico applicato nel corso di un prolungato periodo di tempo (21 giorni) (come descritto precedentemente nel paragrafo 2.2.4).

I 21 giorni per le tre temperature sperimentali sono stati raggiunti in periodi sfalsati in modo che lo svolgimento dei test comportamentali nelle diverse temperature non si sovrapponevano.

Nel periodo di trattamento termico si procedeva alla misurazione della temperatura due volte al giorno (10.00 e 17.00) e si registravano eventuali fluttuazioni; saltuariamente sono state osservate variazioni di $\pm 1^\circ\text{C}$ dal valore desiderato. Per evitare il contatto visivo tra i pesci appartenenti alle diverse vasche di mantenimento sono stati posizionati dei pannelli coprenti tra di esse.

Durante i 21 giorni di trattamento termico si è somministrato cibo agli animali con la stessa procedura descritta precedentemente nel paragrafo 2.2.5. In questa fase sono morti quattro pesci nella vasca mantenuta a 34°C e uno nella vasca mantenuta a 26°C. Per far in modo che gli ultimi soggetti sperimentali pescati avessero una condizione sociale simile a quella dei primi soggetti sperimentali catturati, si sono lasciati in ogni vasca sperimentale (18, 26 e 34°C) un gruppo di cinque individui che fungeva da banco e che non era sottoposto ai test comportamentali. Di

conseguenza, il numero di soggetti sperimentali che si è ottenuto dalle vasche mantenute a 18, 26 e 34°C è stato rispettivamente di 17, 16 e 12 animali.

Al raggiungimento dei 21 giorni di temperatura si effettuavano quattro prove comportamentali (*dark/light preference test*, *novel diving tank test*, *group preference test* e *mirror test*). Una volta che il soggetto sperimentale aveva concluso la batteria di quattro test veniva spostato in una vasca (di seguito chiamata “vasca finale”) uguale nelle dimensioni e aspetto, temperatura e chimica dell’acqua, a quella di mantenimento. In questo modo i pesci già sperimentati non potevano essere catturati una seconda volta per effettuare i test comportamentali.

Terminata la fase delle prove comportamentali, tutti gli animali (i cinque pesci tenuti a fare da banco e i soggetti sperimentali) venivano pesati e rilasciati nella vasca finale. In seguito il gruppo di ricerca dell’Università di Copenhagen, *Laboratory of Aquatic Pathobiology* procedeva al sacrificio di tutti gli animali, attraverso un eccesso di feniletanolo (8 ml/L) per le analisi di natura neurochimica. I tre pesci usati per fare da stimolo sociale nel *group preference test* sono stati impiegati per altri studi.

Tutte le procedure di mantenimento rispettavano sia i requisiti per la cura e la sistemazione degli animali come indicato dall’allegato III, sezione B della Direttiva 2010/63/EU, sia le linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici come riportate nella Raccomandazione 2007/526/EC.

2.2.7 Test comportamentali condotti sul pesce zebra

Il comportamento di tutti i pesci è stato videoregistrato durante sessioni sperimentali che si svolgevano sempre in una fascia oraria compresa tra le 10.00 e le 17.00. In questo periodo è stata condotta una batteria di test comportamentali (tre nel trattamento termico di breve periodo, quattro nel trattamento termico di lungo periodo), eseguiti uno di seguito all’altro. Lo svolgimento di questi test ha previsto la separazione del soggetto sperimentale dal resto del gruppo ed il suo inserimento in apposite vasche sperimentali.

Tutti i test fatti agli animali sono stati condotti in una stanza vuota e con pareti chiare, per ridurre gli stimoli visivi esterni che avrebbero potuto distrarre i soggetti testati dagli stimoli sperimentali che gli venivano presentati. La stanza è stata mantenuta alla temperatura della vasca sperimentale per far in modo che, durante il test comportamentale, non ci fossero variazioni di temperatura dell’acqua. La condizione termica dell’acqua è stata regolarmente controllata al termine di ogni prova e, grazie all’ausilio del condizionatore, non si sono registrate variazioni maggiori di $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Le videoregistrazioni sono avvenute mediante una videocamera Sanyo (VPC-GH1, Vietnam), posta

frontalmente a circa 50 cm dalle vasche sperimentali; in questo modo è stato possibile avere una completa inquadratura dell'acquario. Il soggetto sperimentale veniva catturato con un retino e quindi posto in un *beacker* da 50 ml non trasparente, nel quale restava per circa un minuto prima di esser rilasciato nella vasca sperimentale.

Come da letteratura si è deciso di mantenere un ordine costante dei test, al fine di minimizzare l'interferenza tra i diversi test eseguiti (Gerlai *et al.*, 2000; Blaser e Gerlai, 2006). Inoltre si è costruito un disegno sperimentale tale da garantire un numero minimo di catture al soggetto sperimentale, attraverso la scelta di un ordine dei test che permettesse di effettuare alcune prove nella stessa vasca sperimentale. L'ordine scelto è stato: i) *novel diving tank test* e ii) *dark/light preference test*, eseguiti come primo e secondo test in alternanza tra di loro; iii) *group preference test* e iv) *mirror test*, eseguiti come terzo e quarto test in alternanza tra di loro. Nel breve periodo il *group preference test* è sempre stato eseguito come ultima prova e il *mirror test* non è stato eseguito.

Dark/light preference test. Questo è un test d'ansia che si basa sulla naturale preferenza per gli ambienti scuri osservata nel pesce zebra e in molti pesci teleostei (Jesuthasan, 2012; Maximino *et al.*, 2010a,b; Serra *et al.*, 1999; Speedie e Gerlai, 2008). Il comportamento in questa prova (per esempio, l'attività attuata nella porzione bianca della vasca) è influenzato dal conflitto tra la preferenza dell'animale verso le aree protette (substrato scuro, dove è possibile essere criptici) e un'innata motivazione ad esplorare ambienti nuovi (Maximino *et al.*, 2010a,c). Dopo una revisione della letteratura (Blaser *et al.*, 2010; Champagne *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2011) si è deciso di utilizzare una vasca in plexiglass non riflettente (per evitare la tendenza di questi animali ad interagire con un eventuale riflesso; Maximino *et al.*, 2011), suddivisa in una metà bianca ed una metà nera, di dimensioni di 33 x 18 x 18 cm (lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondente a circa 10L di acqua), riempita con 4L di acqua a temperatura sperimentale (18, 26 e 34°C). Inoltre, era presente una zona centrale, per metà nera e per metà bianca, di dimensioni 5 x 18 x 18 cm (lunghezza x altezza x ampiezza), provvista di due porte scorrevoli trasparenti (per permettere al soggetto sperimentale di vedere le due diverse metà dell'acquario) dove veniva alloggiato il pesce prima di iniziare la prova. A metà della vasca erano presenti anche due setti trasversali trasparenti per rendere più stretto il passaggio tra le due aree, quella bianca e quella nera, di modo tale da evitare che i pesci potessero spostarsi dall'una all'altra zona a causa di un nuoto veloce. La zona nera è stata coperta con un pannello scuro (Fig. 2.5).



Fig. 2.5. Vasca per il *dark/light preference test*

Dopo circa 30 secondi dall'inserimento del pesce nella parte centrale, iniziava la videoregistrazione (della durata di 10 minuti) e le due porte scorrevoli venivano sollevate simultaneamente per dar modo al soggetto sperimentale di scegliere in quale parte della vasca stare. Poiché in questo test le pareti della vasca sperimentale non erano trasparenti, la telecamera è stata posta circa a 80 cm di altezza sopra la metà vasca bianca. Terminata la prova il pesce veniva catturato con un retino e posto nuovamente nel *beacker* per circa un minuto.

Novel diving tank test. Questo è un test d'ansia che serve ad analizzare la risposta degli animali all'esposizione ad un nuovo ambiente. Il pesce si trova di fronte al dilemma se esplorare un ambiente nuovo, potenzialmente fonte di risorse alimentari, partner riproduttivi e rifugi, o restare immobile a causa della paura di un ambiente sconosciuto, fonte di potenziali pericoli (Champagne *et al.*, 2010). In questa prova il danio zebrato può esibire un'elevata attività all'inizio dell'osservazione che si stabilizza con l'abituazione all'ambiente (Gerlai, 2003), oppure può mostrare comportamenti legati all'ansia, tipo la totale immobilità (Gerlai *et al.*, 2000). Dopo una revisione della letteratura (Jesuthasan, 2012; Sackerman *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2010) si è deciso di utilizzare una vasca avente base inferiore a forma di triangolo equilatero, con lati del triangolo di 30 cm e altezza di 22 cm (corrispondenti a 8L di acqua circa), riempita con 4L di acqua a temperatura sperimentale (18, 26 e 34°C) (Fig. 2.6). La videoregistrazione (della durata di 10 minuti) iniziava nel momento in cui il pesce era inserito nella vasca sperimentale attraverso il *beacker*. Terminato il test, il pesce veniva catturato con un retino e posto nuovamente nel *beacker* per circa un minuto.



Fig. 2.6. Vasca per il *novel diving tank test*

Group preference test. Il pesce zebra è un animale altamente sociale, che in condizioni normali esibisce comportamenti sociali, come nuotare in banco, preferenze sociali (Engeszer *et al.*, 2004; Grossman *et al.*, 2011; Riehl *et al.*, 2011) e fenomeni di aggressività (Oliveira *et al.*, 2011). La naturale preferenza a stare in gruppo mostrata da questo pesce è alla base del paradigma sperimentale usato in questo test comportamentale. Dopo una revisione della letteratura (Blaser e Gerlai, 2006; Gerlai *et al.*, 2000) si è deciso di utilizzare una vasca di dimensioni 28 x 25 x 16 cm (lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondente a circa 10L di acqua), riempita con 4L di acqua a temperatura sperimentale (18, 26 e 34°C). La vasca sperimentale aveva sui lati destro e sinistro due partizioni scure che impedivano la vista di due acquari adiacenti, entrambi di dimensioni identiche e con lo stesso quantitativo di acqua. Una delle due vasche adiacenti conteneva tre pesci zebra non familiari (delle stesse dimensioni e della stessa età del soggetto testato) rappresentanti lo stimolo sociale, l'altra vasca era vuota. Dopo 30 secondi da che il pesce era stato posto nella vasca sperimentale centrale si iniziava la videoregistrazione (della durata di 10 minuti) e in contemporanea venivano rimossi i due pannelli laterali (Fig. 2.7). La posizione del gruppo (presentato sul lato destro o sinistro della vasca sperimentale) è stato bilanciato tra le prove. Al termine dell'osservazione venivano riposizionati i pannelli scuri sui lati destro/sinistro della vasca sperimentale e si aspettavano circa 30 secondi prima di dar inizio al test successivo (quando il *group preference test* era condotto come terzo test comportamentale).



Fig. 2.7. *Group preference test*

Mirror test. La stimolazione con l'immagine riflessa dallo specchio è un paradigma tradizionalmente utilizzato per studiare il comportamento affiliativo/aggressivo dei pesci (Desjardins e Fernals, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Pesci zebra solitari che incontrano un altro individuo spesso esibiscono un comportamento agonistico piuttosto che un comportamento affiliativo (Blaser e Gerlai, 2006; Gerlai *et al.*, 2000). Dopo una revisione della letteratura si è deciso di utilizzare una vasca di dimensioni 28 x 25 x 16 cm (lunghezza x altezza x ampiezza, corrispondenti a circa 10L di acqua), con 4L di acqua a temperatura sperimentale (18°C, 26°C, 34°C). Il pesce posto in questa vasca è stato lasciato ambientare per circa 30 secondi; quando la videoregistrazione (della durata di 10 minuti) iniziava si posizionava lo specchio con una angolazione di 22.5° sul lato lungo della vasca con la telecamera posizionata sul lato opposto (in modo che l'immagine riflessa risultasse più vicina da un lato della vasca e più lontana dall'altro) (Fig. 2.8). La posizione dello specchio (immagine riflessa più vicina al lato sinistro/destro dell'acquario) è stata bilanciata tra le prove. Al termine dell'osservazione si rimuoveva lo specchio. Al fine di evitare un'influenza del *group preference test* o del *mirror test* (a seconda di quale veniva svolto prima) sulla scelta del lato della vasca sperimentale in cui sostare, gli stimoli di questi due test non erano mai presentati sullo stesso lato della vasca. In questo modo gli animali che effettuavano prima il *group preference test* e avevano lo stimolo sociale sul lato sinistro, nella prova successiva avevano lo specchio sul lato destro. Viceversa, gli animali che facevano come terza prova il *mirror test* e avevano il riflesso dell'immagine più vicino a sinistra, nella prova successiva (*group preference test*) avevano lo stimolo sociale sul lato destro. In questo modo si è cercato di evitare un effetto “preferenza lato” dovuto alla prova precedente.



Fig. 2.8. *Mirror test*

2.2.8 Etogramma pesce zebra

Il pesce zebra negli ultimi anni è diventato un modello animale molto diffuso anche per gli studi sul comportamento, sia normale che patologico, e come modello per malattie cerebrali (Kalueff *et al.*, 2014; Miller e Gerlai, 2007; Norton e Bally-Cuif, 2007; Stewart *et al.*, 2010). Le risposte comportamentali del danio zebrato sono robuste, conservative dal punto di vista evolutivo e, per alcuni aspetti, somigliano a quelle di molti mammiferi (Bilotta *et al.*, 1999; Champagne *et al.*, 2010). Comunque, poiché è tuttora un modello animale nuovo, la terminologia etologica presenta alcune lacune, mancando di una standardizzazione dettagliata (Kalueff *et al.*, 2013). Inoltre resta ancora da definire completamente il significato evolutivo di alcuni comportamenti poiché le osservazioni di questo pesce in natura sono estremamente difficoltose viste le sue ridotte dimensioni e l'habitat che occupa. In aggiunta è probabile che alcuni comportamenti siano il risultato della condizione di cattività o del trattamento a cui sono sottoposti gli animali impiegati per gli studi comportamentali, motivo per cui trovare una spiegazione ad alcuni comportamenti può risultare difficoltoso. Solo nel 2013 è comparso il primo catalogo del comportamento del pesce zebra, ad opera di Kalueff e colleghi, un primo passo nel tentativo di unificare, attraverso una descrizione dettagliata, la terminologia usata nella ricerca comportamentale eseguita sul *Danio rerio*.

In letteratura, inoltre, è possibile trovare differenti approcci nell'analisi degli stessi test qui eseguiti; per esempio, in alcuni lavori è possibile osservare come i comportamenti non vengano analizzati, dando importanza solo alla distribuzione spaziale degli animali nelle vasche comportamentali (Champagne *et al.*, 2010; Maximino *et al.*, 2011; Ninkovic e Bally-Cuif, 2006). Oppure, in alcuni lavori è possibile osservare come, con l'impiego di un differente software (Ethovision della Noldus), si possano definire le diverse categorie comportamentali sulla base della velocità motoria

degli animali o sulla frequenza di battito delle pinne pettorali e caudale (Blaser e Gerlai, 2006; Mathur e Guo, 2011). Ancora, in alcuni studi, le categorie comportamentali possono esser più sintetiche, con il raggruppamento di più comportamenti sotto un'unica definizione (*locomotory activity, inactivity*: Champagne *et al.*, 2010; Echevarria *et al.*, 2008; Gerlai *et al.*, 2000; Gerlai *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2008).

Poiché alcuni tipici comportamenti compaiono solo in seguito a specifici trattamenti o in particolari fasi di crescita degli animali (Kalueff *et al.*, 2013), in questo studio si è cercato di applicare un etogramma semplificato basato su ciò che è stato definito nella letteratura riportata su test comportamentali simili (Blaser e Gerlai, 2006; Maximino *et al.*, 2010a,b; Stewart *et al.*, 2011; 2012) e sulla base dei comportamenti maggiormente osservati nel corso degli esperimenti condotti con le linee *wild-type* qui utilizzate.

Sono state complessivamente rilevate sei categorie comportamentali comuni a tutti gli animali e a tutti i trattamenti, esibite in tutti i test eseguiti. In un'unica prova (*mirror test*) è stata rilevata una nuova categoria comportamentale.

Le sei categorie comportamentali comuni a tutti i test effettuati e le loro relative definizioni sono:

- *swimming*, nuoto a velocità normale
- *erratic movements*, un nuoto veloce caratterizzato da bruschi ed improvvisi cambiamenti di direzione, spesso eseguito sul fondo della vasca con il corpo inclinato dalla parte della testa; effettuato spesso anche a differenti altezze della colonna d'acqua
- *freezing*, totale immobilità sul fondo, eccetto che per occhi e branchie
- *thrashing*, nuoto impetuoso avanti e indietro contro la parete della vasca
- *floating*, pesce stazionario o che si muove molto lentamente senza usare la pinna caudale; le pinne pettorali possono battere con una frequenza molto bassa
- *slow swimming*, nuoto molto lento, in cui l'animale batte con una frequenza bassa la pinna caudale

Solo per il *mirror test* è stato analizzato un comportamento aggiuntivo l'*aggressive/attack display*, definito come una postura in cui il pesce ha le pinne (dorsale, caudale, pettorali e/o anale) erette, in associazione con dei movimenti ondulati del corpo; spesso sono visibili dei movimenti circolari o a zig-zag di fronte lo specchio e brevi periodi di nuoto veloce verso l'immagine riflessa.

Dalla letteratura è emerso che i comportamenti maggiormente legati a stati di ansia sono il *freezing*, e l'*erratic movements* (Maximino *et al.*, 2010a,b; Stewart *et al.*, 2012). Mentre, lo *swimming* è

l'attività motoria considerata normale per questo animale. Poco è emerso per il *thrashing* dalla letteratura, poiché è uno di quei comportamenti di difficile interpretazione, probabilmente perché espresso solo in un ambiente di cattività. Alcuni autori lo sommano allo *swimming* e prendono in considerazione un'unica grande categoria "*locomotory activity*" (Gerlai *et al.*, 2006; López-Patiño *et al.*, 2008), che renderebbe in qualche modo il *thrashing* simile allo *swimming*, un movimento normale non indice di uno stato di malessere. Altri autori lo associano al comportamento di tigmotassi (l'evitamento degli spazi aperti), definendolo quindi un comportamento legato all'ansia dello spazio aperto (Blaser *et al.*, 2010; Lockwood *et al.*, 2004). Negli studi sulle sostanze di abuso, dove il comportamento del pesce zebra viene alterato dalla somministrazione di sostanze allucinogene, il *thrashing* è considerato una stereotipia (López-Patiño *et al.*, 2008).

Essendo la letteratura così varia su questo particolare comportamento, in questo studio si è deciso di considerarlo separatamente dal nuoto e di discuterlo caso per caso.

Dalla letteratura è emerso che è di fondamentale importanza la posizione degli animali nella colonna d'acqua quando si lavora con questa specie di pesce, poiché una maggior presenza nella parte bassa della vasca o in vicinanza delle pareti dell'acquario, rappresentano un indice di maggior ansia degli animali (Maximino *et al.*, 2010a,b; Stewart *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2012).

Per cui, a seconda dei test effettuati, sono state considerate le categorie comportamentali associate anche alle zone occupate dai soggetti sperimentali nelle vasche comportamentali.

La zonazione della vasche è stata differente nei diversi test e quindi le posizioni analizzate sono state differenti da prova a prova:

- *dark/light preference test*, è stata analizzata la durata del tempo trascorso nella zona nera e in quella bianca; il tempo trascorso nella zona bianca è stato a sua volta suddiviso in tempo trascorso in prossimità delle pareti e nella zona centrale
- *novel diving tank test*, è stata analizzata la durata del tempo trascorso sul fondo, nella parte centrale e nella parte alta della vasca. La parte centrale è stata volutamente considerata di dimensioni doppie rispetto alle altre parti, per far in modo che la parte alta e bassa della vasca fossero rappresentate da porzioni limitate;
- *group preference test*, è stata analizzata la durata del tempo trascorso nella zona vicino o lontano dal gruppo e nella parte bassa o alta della vasca.
- *mirror test*, è stata analizzata la durata del tempo trascorso nella metà vasca con lo specchio (*mirror zone*) o nella metà vasca senza specchio (*no mirror*); la zona specchio è stata a sua

volta suddivisa in due, una in cui l'immagine riflessa risultasse maggiormente vicina (*near mirror*) e l'altra in cui l'immagine riflessa risultasse più distante (*distant mirror*).

2.2.9 Analisi dei filmati pesce zebra

A partire dal mese di gennaio 2014 si è iniziato a sbobinare ed elaborare i filmati raccolti nel periodo luglio-dicembre 2013, mediante l'utilizzo del software Observer XT 10.5 della Noldus.

A partire dal mese di novembre 2014 si è iniziato a sbobinare ed elaborare i filmati raccolti nel periodo luglio-ottobre 2014, mediante l'utilizzo dello stesso software.

Per ogni soggetto sperimentale nelle differenti prove, sono stati registrati la durata dei diversi comportamenti e del tempo trascorso nelle diverse zone delle vasche.

I comportamenti analizzati (descritti precedentemente nel paragrafo 2.2.8) sono uguali per tutte le prove e si sono scelti sulla base della letteratura disponibile (Blaser e Gerlai, 2006; Maximino *et al.*, 2010a,b; Stewart *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2012) e di seguito riportati: *swimming*, *erratic movements*, *freezing*, *thrashing*, *floating*, *slow swimming*. Solo per il *mirror test* è stato analizzato un comportamento aggiuntivo, l'*aggressive/attack behaviour*. Di ogni comportamento si è registrata la durata.

La zonazione della vasche è stata differente nei diversi test e quindi le posizioni analizzate sono state differenti da prova a prova:

- *dark/light preference test*, durata del tempo (espresso in secondi) nella parte nera/bianca della vasca, e nella zona bianca vicino le pareti/centrale. La zona centrale nella porzione bianca della vasca è stata delimitata da un rettangolo di 10 x 12 cm, lunghezza x larghezza;
- *novel diving tank test*, durata del tempo (espresso in secondi) trascorso nella parte bassa/intermedia/alta della vasca. La parte intermedia è stata considerata doppia rispetto alla parte bassa e alta.
- *group preference test*, è stata analizzata la durata del tempo (espresso in secondi) trascorso vicino/distante lo stimolo sociale (il gruppo) e nella zona bassa/alta della vasca. In questa prova per delimitare le zone sono state semplicemente divise a metà la lunghezza della vasca (vicino/lontano) e la colonna d'acqua (porzione alta/porzione bassa);
- *mirror test*, è stata analizzata la durata del tempo (espresso in secondi) trascorso nella *mirror zone* /*no mirror* ; la zona dello specchio a sua volta è stato suddiviso in due zone: *near mirror*/*distant mirror*.

2.2.10 Analisi statistica pesce zebra

L'unità sperimentale è l'individuo. Il totale del campione è così costituito:

- 1) Per i pesci zebra *wild-type* linea commerciale nel trattamento termico di breve periodo: N=10 per 18, 26 e 34°C
- 2) Per i pesci zebra *wild-type* linea commerciale nel trattamento termico di lungo periodo: N=25 per 18, 26 e 34°C.
- 3) Per i pesci zebra *wild-type* linea AB nel trattamento termico di lungo periodo: N= 17 per 18°C, N=16 per 26°C e N=12 per 34°C.

L'elaborazione statistica è stata effettuata attraverso l'impiego del software Statview II (Abacus Concepts). Le variabili sono state inizialmente analizzate applicando una analisi non parametrica, attraverso il test di Kruskal-Wallis (confronti multipli effettuati attraverso il test di Mann-Whitney). Si è proceduto anche ad una analisi parametrica dell'ANOVA, semplice e per misure ripetute; i confronti multipli sono stati eseguiti con il test Tukey/Kramer. Il livello di significatività è stato posto pari a 0.05. Qui sono presentati quei risultati dell'analisi parametrica che risultavano essere significativi anche nella analisi non parametrica, poiché i grafici ad istogrammi sono di più facile lettura.

Le prove comportamentali, della durata di dieci minuti, sono state analizzate sia nel totale che suddivise in cinque intervalli da due minuti ciascuno, per vedere l'andamento del comportamento sia nella totalità del test che nel susseguirsi dei minuti.

Inoltre, le prove comportamentali sono state analizzate sia inter-temperatura che intra-temperatura.

3 RISULTATI

3.1 Trattamento termico in *Dicentrarchus labrax*

Prima di considerare, entro ogni temperatura, i 25 soggetti sperimentali come unico campione e quindi analizzarli insieme, si è verificato, attraverso analisi statistica, che la stabulazione in diverse vasche non avesse influito sul comportamento. L'eventuale presenza di un "effetto vasca" intra-temperatura è stata valutata per tutti i comportamenti osservati e per ogni test. Nessun risultato statisticamente significativo è stato trovato per questo fattore, pertanto le diverse replicate si sono potute considerare uguali.

3.1.1 Test di foraggiamento. In questo test non è stato trovato nessun effetto della temperatura per quanto riguarda i comportamenti del *first biting* e del *feeding*, anche se i pesci mantenuti per 21 giorni alla temperatura più alta (28°C) hanno mostrato un numero di eventi di *feeding* lievemente superiore (una media di 19 eventi di predazione) rispetto alle spigole mantenute alle altre due temperature (un media di 15 e 16 eventi di predazione, rispettivamente per i 18 e i 22°C).

E' stato trovato un effetto della temperatura sui comportamenti del *fin raising* ($H_2=6,90$; $P<0.01$) e del *fast swimming* ($H_2=11,366$; $P<0.01$). I confronti multipli hanno mostrato che le spigole mantenute a 28°C hanno compiuto un numero di eventi di *fin raising* significativamente maggiore rispetto ai pesci mantenuti a 18°C e trascorso un tempo maggiore nell'attività di *fast swimming* rispetto ai pesci mantenuti a 18 e 22°C (Fig. 3.1 e 3.2).

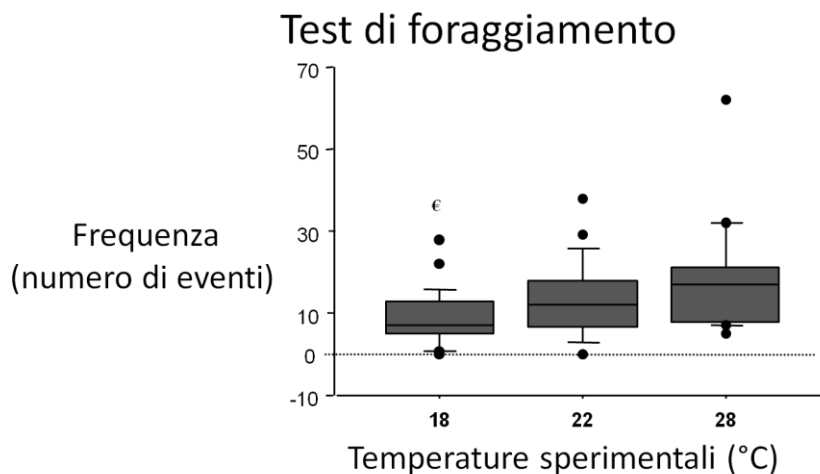


Fig. 3.1. Frequenza del comportamento di *fin raising*. Il box-plot descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni box-plot contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il box delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. * indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 28°C ($P<0.05$). (n=25; N=75)

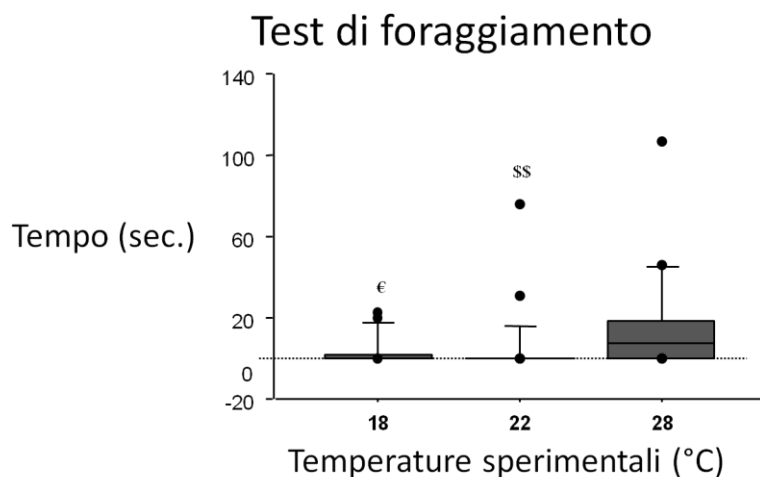


Fig. 3.2. Durata del comportamento di *fast swimming*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. € indica una differenza significativa tra 18°C e 28°C ($P<0.05$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P<0.01$). (n=25; N=75)

3.1.2 Test olfattivo. In questo test è stato trovato un effetto della temperatura solo sul comportamento del *fin raising* ($H_2=12,861$; $P<0.01$), mentre per tutti gli altri comportamenti presi in considerazione non è stato trovato un effetto dovuto alla temperatura. In particolare, dai confronti multipli è risultato che le spigole mantenute a 28°C hanno compiuto un numero di eventi di *fin raising* significativamente maggiore rispetto ai pesci mantenuti a 18°C (Fig. 3.3).

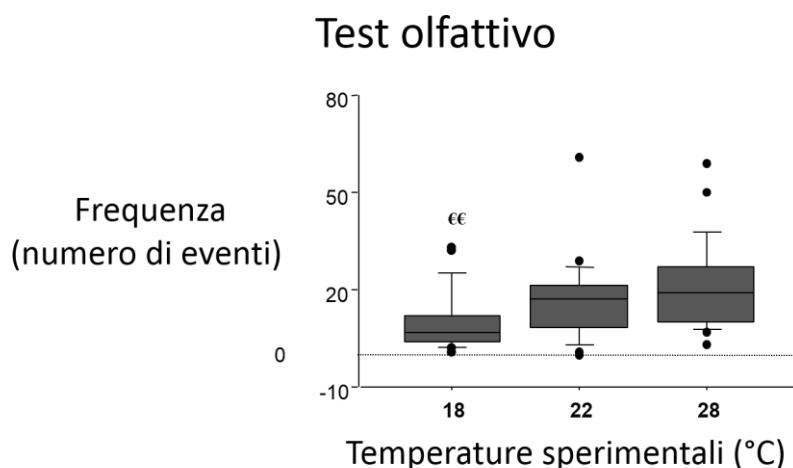


Fig. 3.3. Frequenza del comportamento di *fin raising*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. €€ rappresenta una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 28°C ($P<0.01$). (n=25; N=75)

Dal test di Mann-Whitney è risultato anche che gli animali mantenuti a 22°C hanno effettuato un numero di *fin raising* maggiore rispetto alle spigole tenute alla temperatura più bassa, ma nell'applicare la correzione di Bonferroni-Holm questa differenza non si è mantenuta significativa. Per tutti gli altri comportamenti analizzati, sia in frequenza che in durata, non si osservano effetti dovuti alla temperatura sperimentale.

3.1.3 Mirror test. In questo test è risultato esserci un effetto della temperatura nella misura della *latency to the contact with the mirror* ($H_2=7,263$; $P<0.05$), nei comportamenti di *arousal* ($H_2=10,135$; $P<0.01$), *C-start reaction* ($H_2=6,544$; $P<0.05$), *C-start right reaction* ($H_2=8,262$; $P<0.05$) e *contact with the mirror* ($H_2=8,319$; $P<0.05$). Dai confronti multipli si osserva che le spigole mantenute alla temperatura sperimentale maggiore (28°C) hanno avuto una latenza al contatto con lo specchio significativamente maggiore rispetto ai soggetti sperimentali provenienti dagli altri due trattamenti termici (22°C e 18°C) (Fig. 3.4).

Inoltre, gli animali mantenuti a 22°C hanno avuto un numero di *contact with the mirror* (Fig. 3.5), di *C-start reaction* (Fig. 3.6), di *C-start right reaction* (Fig. 3.7) e una durata del comportamento di *arousal* (Fig. 3.8) significativamente maggiori rispetto ai pesci mantenuti a 28°C.

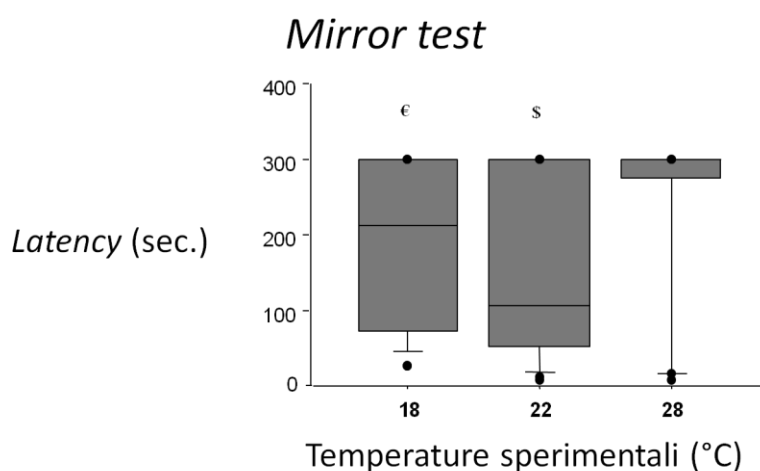


Fig. 3.4. *Latency to the contact with the mirror*. Il box-plot descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni box-plot contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il box delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. € indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 28°C ($P<0.05$), \$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P<0.05$). (n=25; N=75)

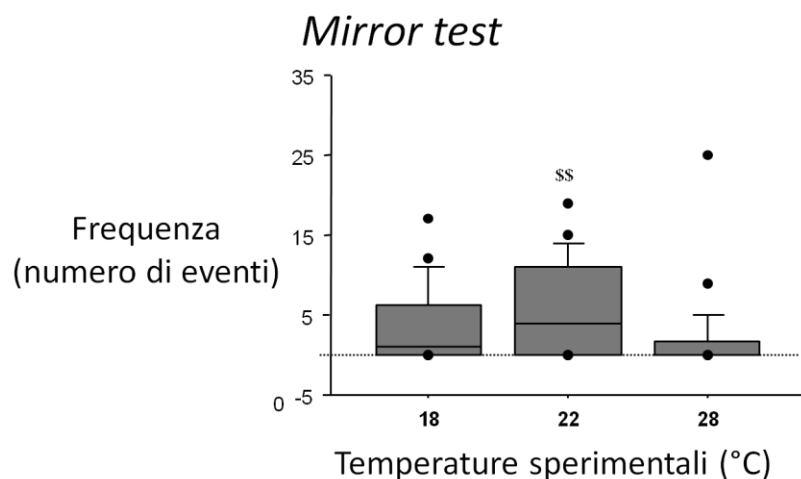


Fig. 3.5. Frequenza del comportamento *contact with the mirror*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

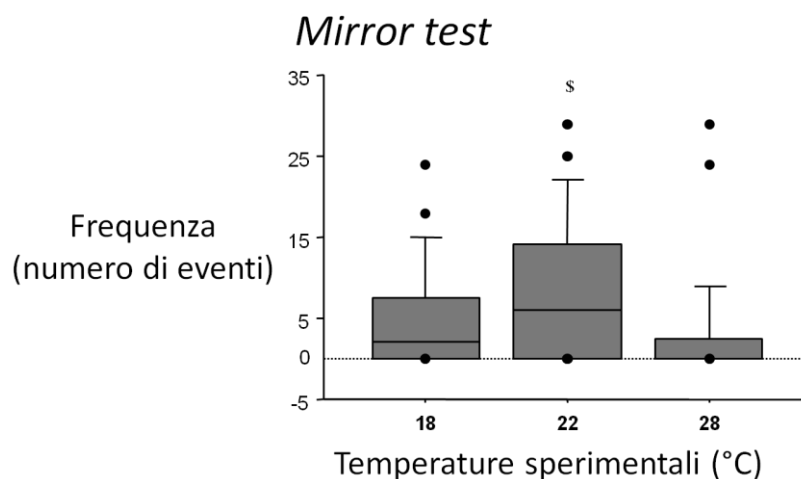


Fig. 3.6. Frequenza del comportamento di *C-start reaction*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. \$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

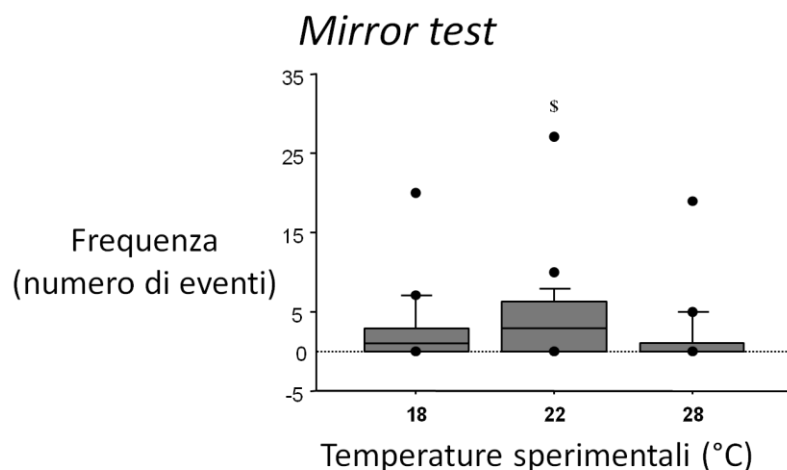


Fig. 3.7. Frequenza del comportamento di *C-start right reaction*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. \$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

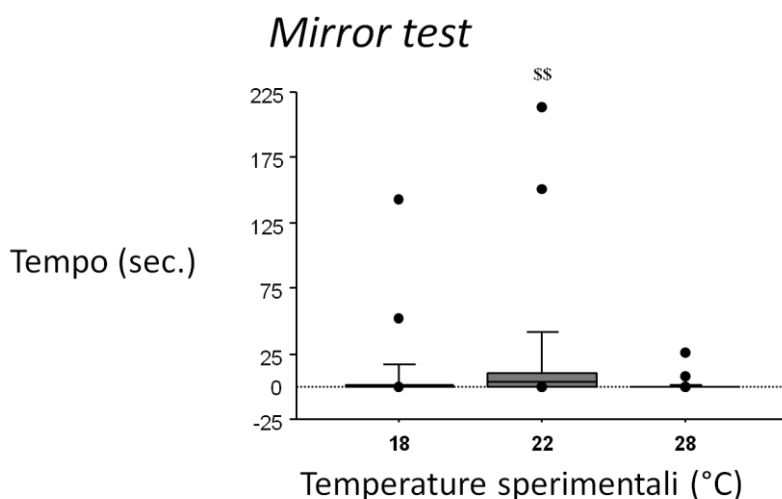


Fig. 3.8. Durata del comportamento di *arousal*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

3.1.4 Test avversivo. Con alcuni animali provenienti dalle vasche mantenute a 18°C e 22°C non è stato possibile eseguire questo test, poiché hanno mostrato per l'intero tempo della sessione sperimentale uno stato di immobilità in vicinanza di una parete dell'acquario. Questo ha reso impossibile procedere all'inserimento dello stimolo avversivo, poiché ciò richiedeva che il soggetto fosse al centro della vasca al momento dell'input negativo (vedere paragrafo 2.1.3). Quindi in

questa prova comportamentale abbiamo un numero di soggetti sperimentali di 25, 19 e 24 rispettivamente per le temperature di 28°C, 22°C e 18°C.

In questo test è risultato un effetto del trattamento termico sulla latenza all'*escape response* ($H_2=11,278$; $P<0.01$) e sulla durata del comportamento di *inactivity* ($H_2=6,502$; $P<0.05$). Dai confronti multipli si osserva che gli animali acclimatati alla temperatura più alta hanno una latenza all'*escape response* minore rispetto agli animali mantenuti a 22°C (Fig. 3.9) e una durata del comportamento di *inactivity* maggiore rispetto a quelli mantenuti alla temperatura intermedia, differenza che però non si mantiene dopo la correzione di Bonferroni-Holm.

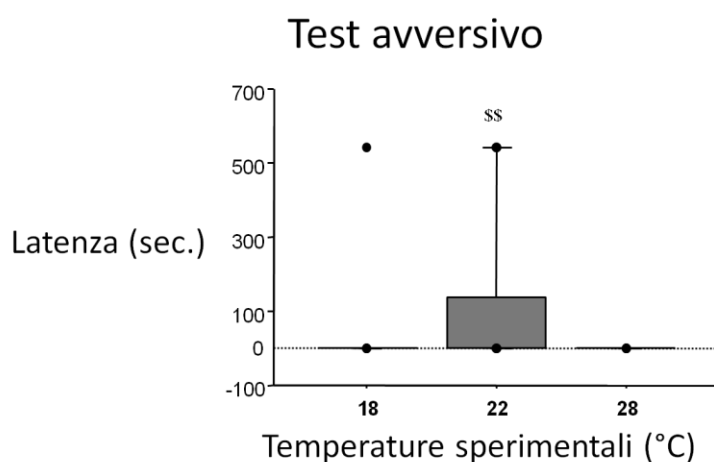


Fig. 3.9. Latenza al comportamento di *escape response*. Il *box-plot* descrive le caratteristiche della distribuzione. Ogni *box-plot* contiene una linea centrale che rappresenta la mediana; il *box* delinea il 25-75% dei dati; la barra superiore rappresenta il 90° percentile, quella inferiore il 10° percentile; i pallini rappresentano punti isolati. Il confronto statistico è stato effettuato mediante test non parametrico di Kruskal-Wallis; i *post-hoc* sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney, a cui è stata applicata la correzione di Bonferroni-Holm. \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P<0.01$). (n18°C=24, n22°C=19, n28°C=25; N=68)

3.1.5 Peso degli animali. In un sottocampione di 38 pesci è stata osservata un'influenza del trattamento termico sul peso degli animali ($H_2=16,615$; $P<0.01$). Dai confronti multipli si evince che il peso medio dei pesci acclimatati per 21 giorni al trattamento termico di 28°C è significativamente maggiore del peso medio degli animali mantenuti alle altre due temperature sperimentali; inoltre, anche il peso medio delle spigole tenute a 22°C risulta in maniera statisticamente significativa maggiore rispetto al peso di quelle soggette al trattamento termico più basso (Fig. 3.10).

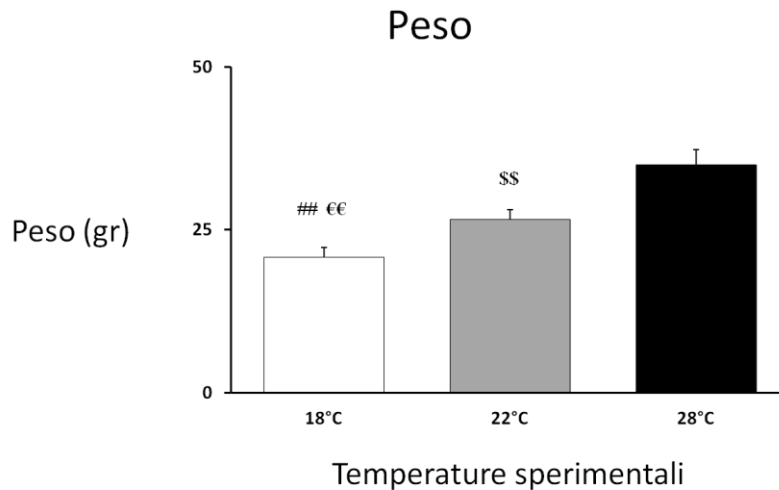


Fig. 3.10. Peso delle spigole dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 22°C ($P < 0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 28°C, \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 22°C e 28°C ($P < 0.01$). ($n_{18^\circ\text{C}}=14$, $n_{22^\circ\text{C}}=12$, $n_{28^\circ\text{C}}=12$; $N=38$)

3.2 Trattamento termico di breve periodo in *Danio rerio* wild-type linea commerciale

3.2.1 Novel diving tank test. Nel totale dei dieci minuti di osservazione si nota un effetto della temperatura per quanto riguarda la presenza dei pesci zebra nelle varie zone lungo la colonna d'acqua. La temperatura influenza l'utilizzo della parte superiore ($F_{2,27}=6,282$; $P < 0.01$), del mezzo ($F_{2,27}=7,601$; $P < 0.01$) e della parte inferiore della vasca ($F_{2,27}=9,264$; $P < 0.01$). Dai confronti multipli è risultato che gli animali mantenuti alla temperatura più elevata (34°C) per quattro giorni hanno trascorso un maggior tempo nella parte alta della vasca rispetto ai pesci zebra tenuti a 18°C (Fig. 3.11).

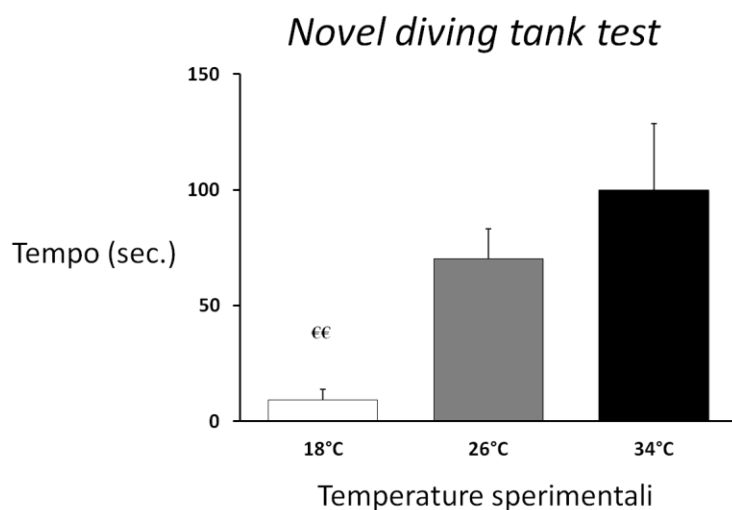


Fig. 3.11. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=10; N=30)

Di contro, i pesci mantenuti alla temperatura più bassa (18°C) hanno trascorso un periodo di tempo significativamente minore nella parte intermedia della vasca rispetto alle altre due temperature sperimentali (26°C e 34°C) e significativamente maggiore nella parte bassa della vasca rispetto alle due temperature sperimentali più alte (26°C e 34°C) (Fig. 3.12).

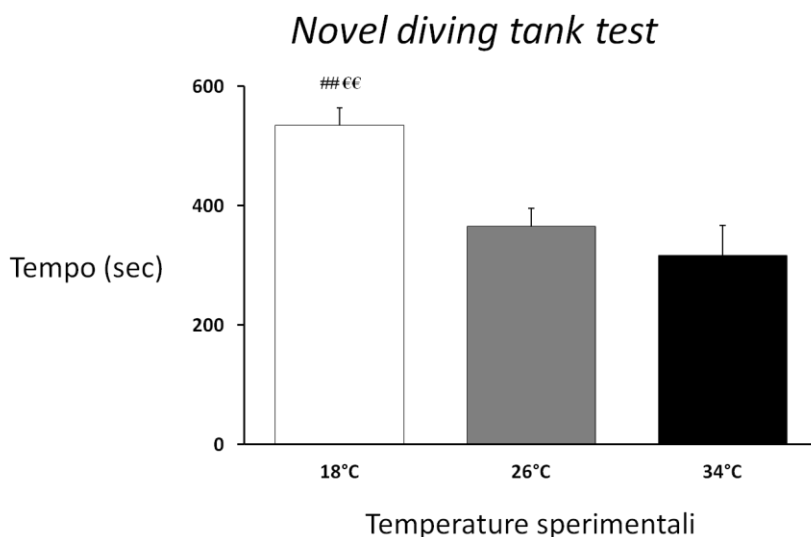


Fig. 3.12. Tempo trascorso nella parte bassa dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), €€ indica una differenza significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=10; N=30)

Nel fare un'analisi intra-temperatura della presenza degli animali nelle diverse zone in cui è stata suddivisa questa vasca, si può osservare che tutti gli animali, indipendentemente dal trattamento termico subito, hanno frequentato in maniera significativamente maggiore il fondo della vasca (18°C: $F_{2,18}=115,838$; $P<0.01$; 26°C: $F_{2,18}=27,556$; $P<0.01$; 34°C: $F_{2,18}=5,988$; $P<0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca suddividendo il tempo del test in cinque intervalli da due minuti ciascuno, non si osservano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda i comportamenti considerati in questo test, si può osservare un effetto della temperatura sperimentale sui comportamenti di *freezing* ($F_{2,27}=25,653$; $P<0.01$), *swimming* ($F_{2,27}=4,793$; $P<0.05$) e *thrashing* ($F_{2,27}=3,656$; $P<0.05$). In questo test non sono stati presi in considerazione i comportamenti di *floating* e *slow swimming* poiché avvenivano molto raramente. Dai confronti multipli risulta che gli animali mantenuti alla temperatura minore (18°C) hanno trascorso un periodo significativamente maggiore esibendo il comportamento di *freezing* rispetto agli animali mantenuti alle altre due temperature sperimentali (Fig. 3.13).

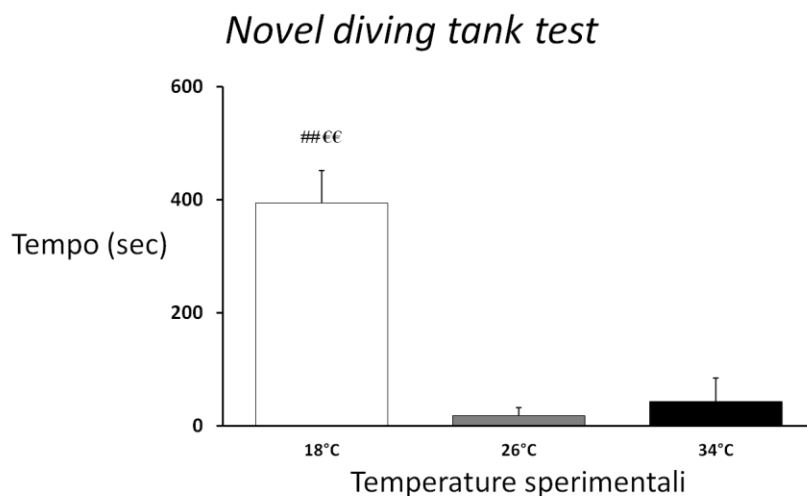


Fig. 3.13. Tempo trascorso nel comportamento di *freezing* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$). (n=10; N=30)

I confronti multipli indicano che i pesci zebra tenuti alle due temperature maggiori hanno trascorso un tempo maggiore esibendo il comportamento di *swimming* rispetto agli animali che erano sottoposti al trattamento termico più basso (Fig. 3.14).

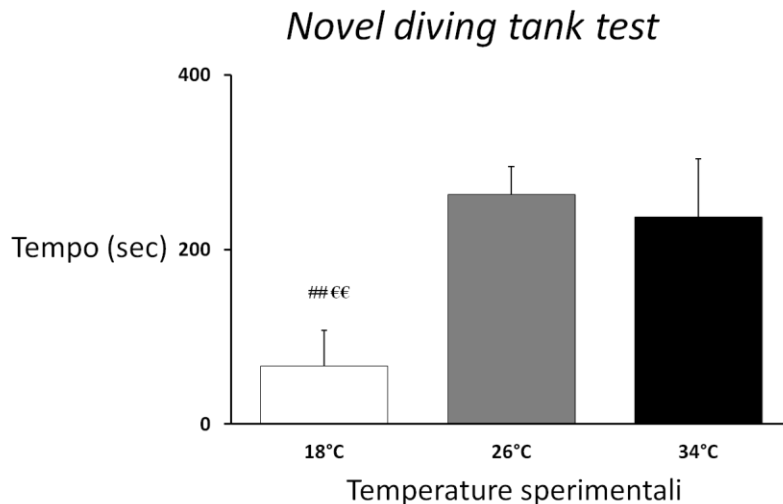


Fig. 3.14. Tempo trascorso nel comportamento di *swimming* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=10; N=30)

Invece, per quanto riguarda il *thrashing*, dai confronti multipli non si conferma la differenza significativa ($P=0.039$) tra le tre differenti temperature, poichè la correzione insita nel test della varianza fa sì che la differenza tra la durata del *thrashing* dei pesci mantenuti a 18°C e le altre temperature sia *borderline* ($P > 0.05$ ma < 0.10).

Inoltre, analizzando i comportamenti degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno, si può osservare che il comportamento di *freezing* ($F_{8,108}=2,934$; $P < 0.01$) e di *swimming* ($F_{8,108}=2,909$; $P < 0.01$) risultano significativamente differenti con il trascorrere del tempo. Dai confronti multipli infatti si può notare come gli animali mantenuti a 18°C esibiscano un comportamento di *freezing* significativamente maggiore nei primi due minuti di osservazione rispetto agli ultimi due minuti del test (Fig. 3.15).

Invece per quanto riguarda lo *swimming* risulta che i pesci mantenuti alla temperatura di 26°C nel corso dei primi due minuti di osservazione passano un tempo significativamente inferiore a nuotare rispetto agli ultimi due minuti del test, mentre i pesci mantenuti a 34°C nel corso dei primi due minuti di osservazione passano un tempo significativamente inferiore a nuotare rispetto al secondo intervallo da due minuti (Fig. 3.16).

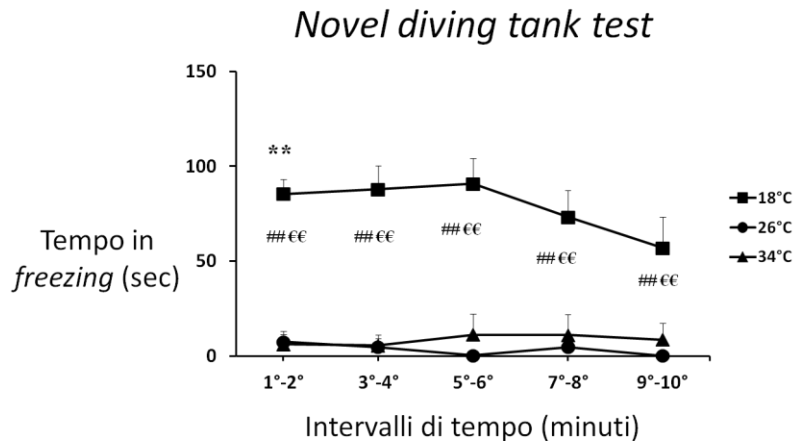


Fig. 3.15. Tempo trascorso nel comportamento di *freezing* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$). ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso in *freezing* nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti nella temperatura di 18°C ($P<0.01$). (n=10; N=30)

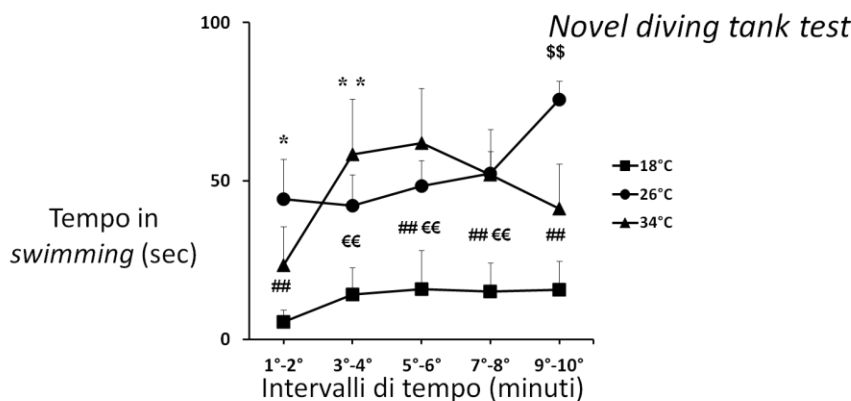


Fig. 3.16. Tempo trascorso nel comportamento di *swimming* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), €€ indica una differenza significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). * e ** indicano rispettivamente una differenza significativa tra il tempo trascorso in *swimming* nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti negli animali mantenuti a 26°C ($P<0.05$) e una differenza significativa tra il tempo trascorso in *swimming* nei primi due minuti rispetto al secondo intervallo di due minuti negli animali mantenuti a 34°C ($P<0.01$). (n=10; N=30)

3.2.2 Dark/light preference test. Per quanto riguarda la distribuzione dei pesci zebra nelle zone in cui è suddivisa questa vasca nel totale dei dieci minuti di osservazione si può rilevare un effetto principale della temperatura sia per la durata del tempo trascorso nella zona nera ($F_{2,26}=37,257$; $P<0.01$) che in quella bianca ($F_{2,26}=37,212$; $P<0.01$). Dai confronti multipli risulta che i *Danio rerio* tenuti per quattro giorni a 18°C hanno trascorso un periodo di tempo significativamente maggiore

nella parte nera (565,6 secondi di media $\pm 15,7$ SE) rispetto agli animali mantenuti alle altre due temperature sperimentali. Inoltre, i pesci mantenuti alla temperatura intermedia (26°C) hanno trascorso un tempo significativamente maggiore (243,6 secondi di media $\pm 59,1$ SE) nella parte nera della vasca rispetto ai pesci tenuti alla temperatura di 34°C. Di contro, gli animali tenuti a 34°C hanno trascorso nella parte bianca della vasca sperimentale 559,7 secondi di media ($\pm 37,8$ SE) (Fig. 3.17). Infatti, analizzando la distribuzione intra-temperatura, risulta che i *Danio rerio* mantenuti a 18°C trascorrono un tempo significativamente maggiore nella porzione nera della vasca ($F_{1,8}=283,664$; $P<0.01$) mentre quelli acclimatati per quattro giorni a 34°C trascorrono un intervallo di tempo significativamente maggiore nella porzione bianca ($F_{1,9}=47,133$; $P<0.01$). Per i pesci acclimatati a 26°C, invece, non si rileva nessuna preferenza per le due differenti partizioni della vasca sperimentale.

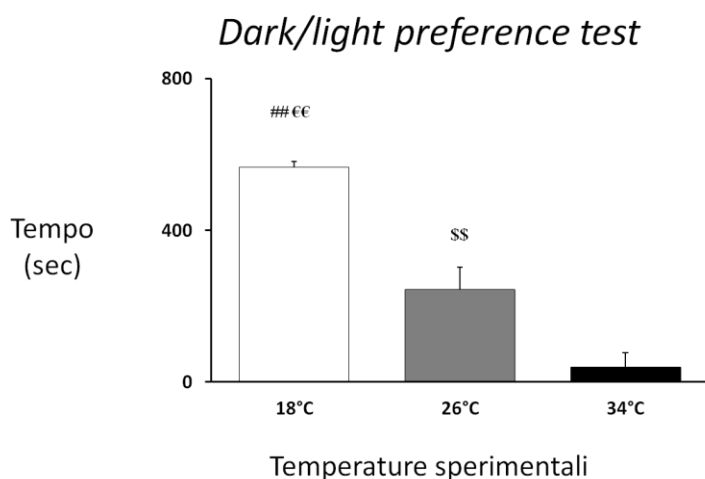


Fig. 3.17. Tempo trascorso nella parte nera dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media \pm SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). (n=10; N=30)

Per quanto riguarda il tempo trascorso nelle due zone in cui è stata divisa la parte bianca della vasca sperimentale (la zona bianca vicina le pareti della vasca e la zona bianca centrale) sono stati presi in considerazione solo i soggetti mantenuti alle due temperature maggiori (26°C e 34°C) poiché i pesci tenuti a 18°C hanno trascorso nella parte bianca solo un periodo limitato di tempo. È stata riscontrata un'influenza della temperatura sul tempo trascorso nella zona vicina le pareti che è maggiore per la temperatura di mantenimento più elevata ($F_{2,26}=21,663$; $P<0.01$). Se si stima il tempo trascorso nella parte bianca vicino la parete come percentuale del tempo totale trascorso nella

porzione bianca di vasca dagli animali mantenuti alle due temperature più alte, possiamo però osservare che i pesci mantenuti rispettivamente a 26 e 34°C trascorrono vicino la parete il 71% ($\pm 5,65$ SE) il 76% ($\pm 6,36$ SE) del loro tempo. Infatti, effettuando un'analisi intra-temperatura, sia i 26°C che i 34°C hanno trascorso un tempo significativamente maggiore nella zona bianca vicino la parete (26°C: $F_{1,9}=7,359$; $P<0.05$; 34°C: $F_{1,9}=13,684$; $P<0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, non si osservano differenze statisticamente significative.

In questo test i comportamenti sono stati analizzati per la sola porzione bianca, l'unica visibile, e i comportamenti di *floating* e *slow swimming* sono stati esclusi dalle analisi poiché avvenivano solo per pochi secondi. Essendo presenti nella zona bianca solo gli animali mantenuti alle due temperature maggiori (26°C e 34°C) si è proceduto al confronto dei comportamenti solo tra questi due trattamenti. La durata dello *swimming* è risultata influenzata dalla temperatura, con i pesci tenuti a 34°C che effettuavano questo comportamento in modo significativamente maggiore rispetto agli animali mantenuti alla temperatura intermedia ($F_{2,26}=7,763$; $P<0.01$) (Fig. 3.18).

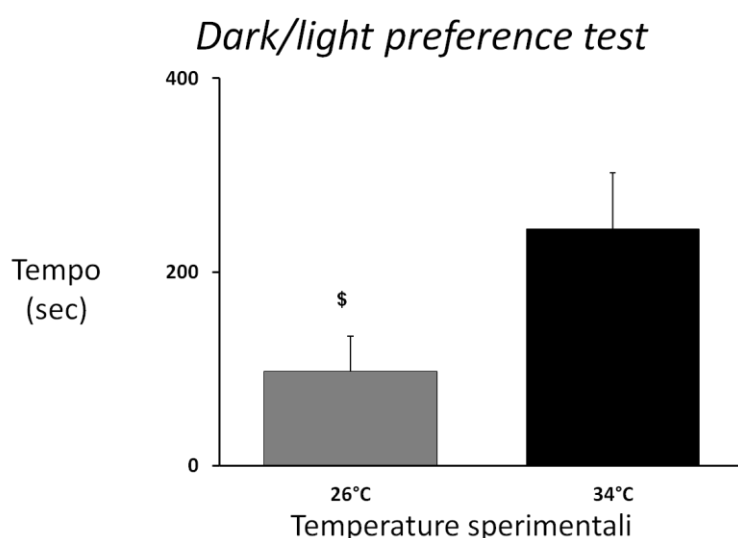


Fig. 3.18. Tempo trascorso nell'attività di *swimming* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. \$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.05$). (n=10; N=30)

L'espressione degli altri comportamenti in durata non è risultata influenzata dalla temperatura di mantenimento.

Analizzando il comportamento degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si rilevano differenze statisticamente significative.

3.2.3 Group preference test. Per quanto riguarda la presenza dei soggetti sperimentali nelle varie zone della vasca e lungo la colonna d'acqua nei dieci minuti del test è stato osservato un effetto della condizione termica sia per l'utilizzo della parte superiore ($F_{2,27}=11,464$; $P<0.01$) e inferiore della vasca ($F_{2,27}=11,420$; $P<0.01$), sia per quanto riguarda la parte vicina ($F_{2,27}=3,730$; $P<0.05$) e lontana ($F_{2,27}=3,705$ $P<0.05$) dallo stimolo sociale (il gruppo). Dai confronti multipli si è potuto osservare che gli animali mantenuti alla temperatura sperimentale più bassa (18°C) hanno trascorso un tempo significativamente minore nella parte alta rispetto ai pesci tenuti alle altre due temperature (26°C e 34°C) (Fig. 3.19).

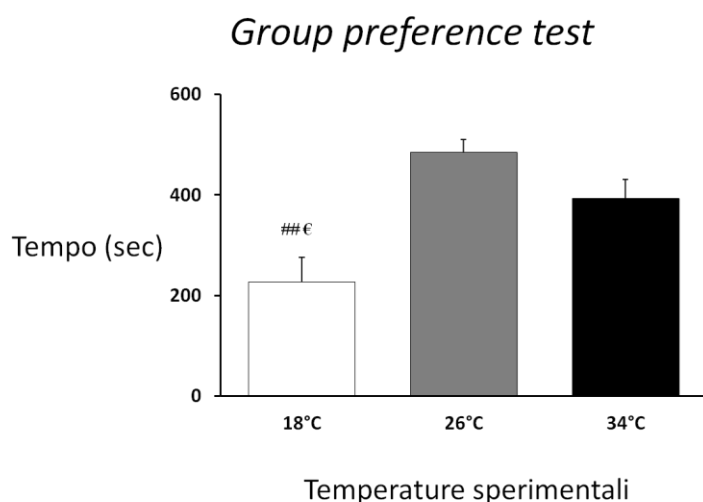


Fig. 3.19. Tempo trascorso nella parte alta dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), € indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.05$). (n=10; N=30)

Inoltre, gli animali mantenuti alla temperatura di 26°C hanno trascorso nella porzione adiacente lo stimolo sociale un intervallo di tempo maggiore rispetto ai soggetti tenuti a 18°C (Fig. 3.20).

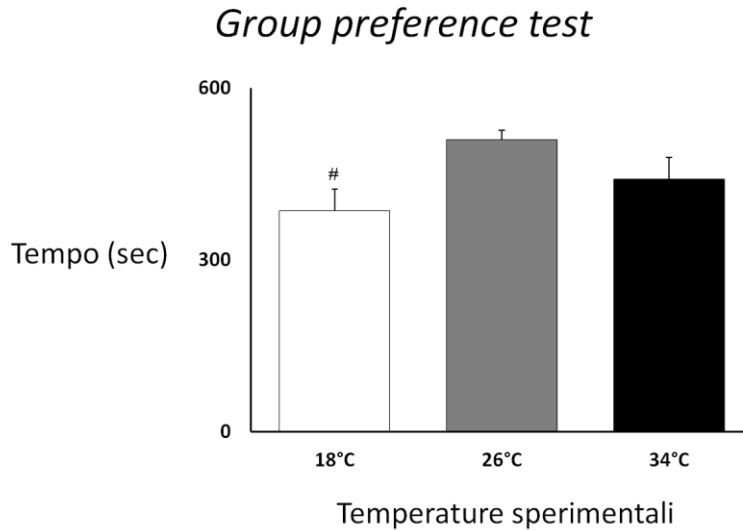


Fig. 3.20. Tempo trascorso nella zona adiacente lo stimolo sociale dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.05$). (n=10; N=30)

Nel fare un'analisi intra-temperatura della distribuzione degli animali nelle varie zone in cui è suddivisa questa vasca si può osservare che tutti gli animali, indipendentemente dal trattamento termico cui sono stati sottoposti, trascorrono un intervallo di tempo significativamente maggiore nella metà vasca adiacente il gruppo di tre pesci (18°C: $F_{1,9}=5,032$; $P < 0.05$; 26°C: $F_{1,9}=165,222$; $P < 0.01$; 34°C: $F_{1,9}=14,048$; $P < 0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione dei pesci nelle diverse zone in cui è stata divisa questa vasca suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno si può notare che i pesci mantenuti a 18°C trascorrono un intervallo di tempo statisticamente maggiore nella porzione alta negli ultimi due minuti di osservazione rispetto ai primi due minuti ($F_{8,108}=5,611$; $P < 0.01$) (Fig. 3.21).

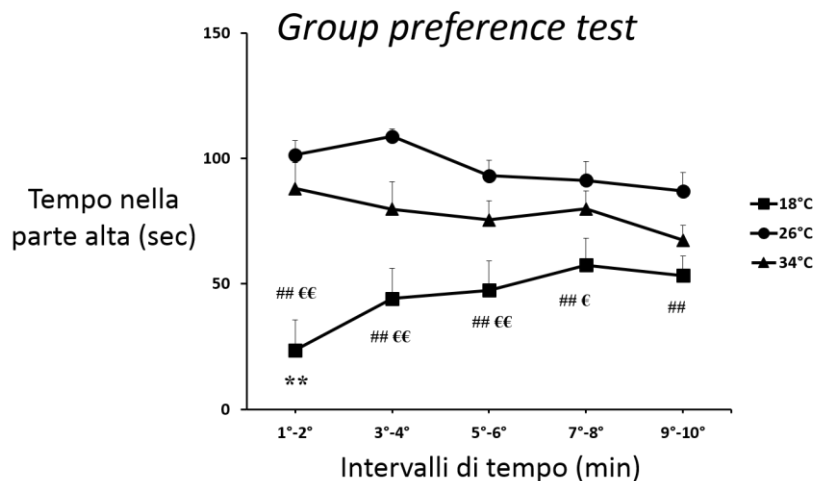


Fig. 3.21. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), € e €€ indicano una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C (rispettivamente $P < 0.05$ e $P < 0.01$). ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso nella parte alta della vasca nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti nella temperatura di 18°C ($P < 0.01$). (n=10; N=30)

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questa prova si è visto un effetto della temperatura sperimentale nei dieci minuti di test solo sul comportamento dell'*erratic movements* ($F_{2,27}=4,134$; $P < 0.05$), che risulta compiuto in modo significativamente maggiore dai soggetti sperimentali provenienti dalla vasca mantenuta a 18°C rispetto agli animali provenienti dalla vasca a temperatura intermedia (Fig. 3.22).

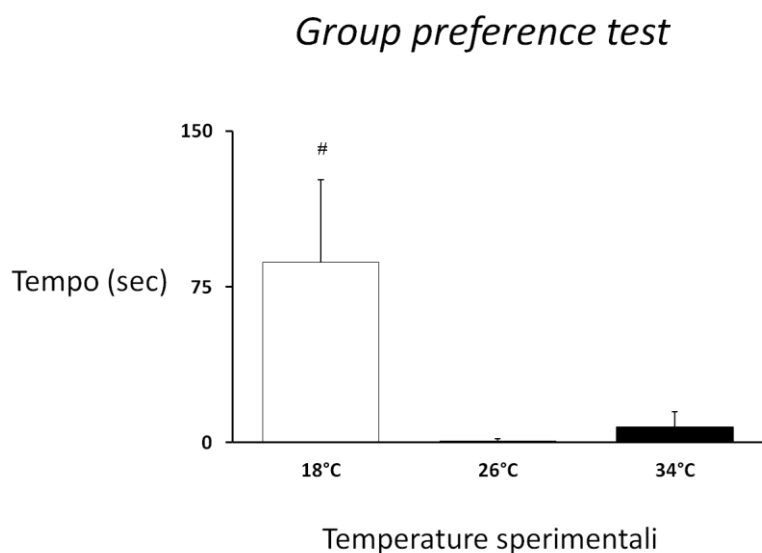


Fig. 3.22. Tempo trascorso nell'attività dell'*erratic movements* dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.05$). (n=10; N=30)

Nel eseguire un'analisi intra-temperatura dei comportamenti si può osservare che tutti i soggetti sperimentali, indipendentemente dal trattamento termico cui sono sottoposti, mostrano di trascorrere in modo significativamente maggiore il tempo nei comportamenti di *thrashing* e *swimming* (18°C: $F_{3,27}=7,974$; $P<0.01$; 26°C: $F_{3,27}=28,419$; $P<0.01$; 34°C: $F_{3,27}=17,317$; $P<0.01$), rispetto agli altri comportamenti analizzati.

Nel fare un'analisi del comportamento degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si notano differenze statisticamente significative.

3.2.4 Peso degli animali. Per quel che riguarda il peso degli animali si può osservare una differenza significativa tra le differenti temperature sperimentali ($F_{2,69}=10,148$; $P<0.01$), in particolare dai confronti multipli si può notare come il peso dei pesci mantenuti a 34°C sia statisticamente inferiore del peso dei pesci mantenuti alle altre temperature sperimentali (26°C e 18°C) (Fig. 3.23).

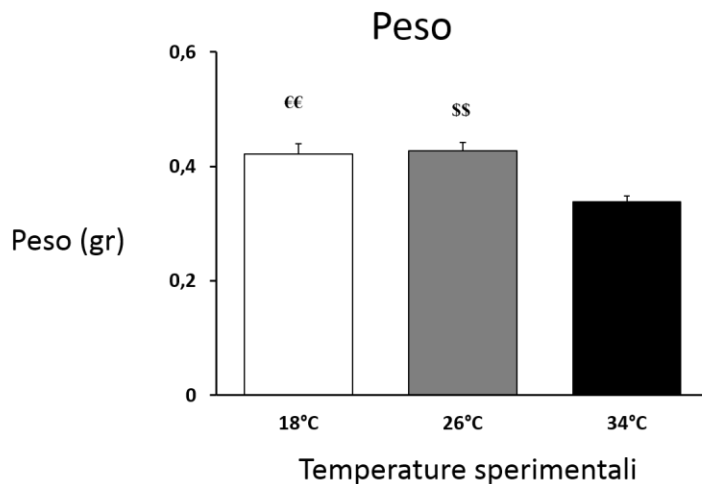


Fig. 3.23. Peso del pesce zebra *wild-type* linea commerciale dopo quattro giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). (n=10; N=30)

3.3 Trattamento termico di lungo periodo in *Danio rerio wild-type* linea commerciale

3.3.1 Novel diving tank test. Nel fare un'analisi della distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa questa vasca nei dieci minuti totali del test, si può notare un effetto della temperatura. In particolare risulta che la temperatura influenza l'utilizzo della parte superiore ($F_{2,72}=19,754$; $P<0.01$) e della parte inferiore della vasca ($F_{2,72}=12,349$; $P<0.01$). Dai confronti multipli è risultato che gli animali mantenuti alla temperatura di 26°C hanno trascorso meno tempo

nella porzione alta dell'acquario rispetto agli individui mantenuti alle altre due temperature sperimentali (Fig. 3.24).

Inoltre, i pesci acclimatati alla temperatura intermedia passano un tempo significativamente maggiore nella parte bassa della vasca rispetto agli animali acclimatati alle altre due temperature (Fig. 3.25).

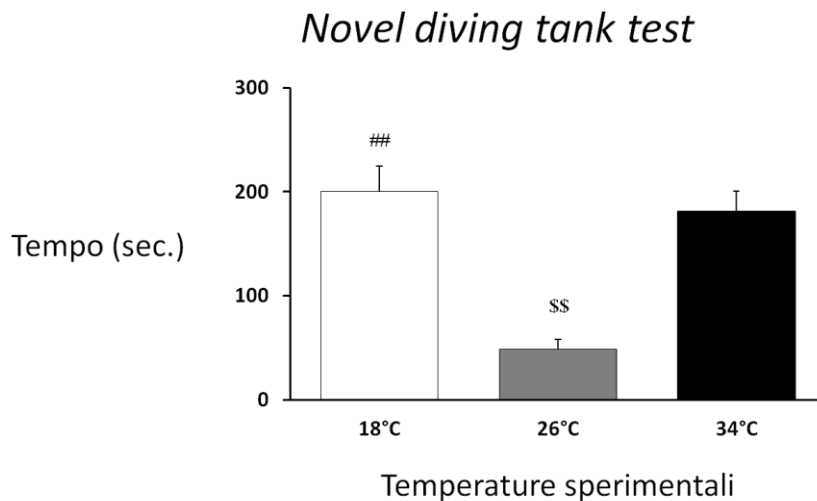


Fig. 3.24. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), \$\$ indica una differenza statistica tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

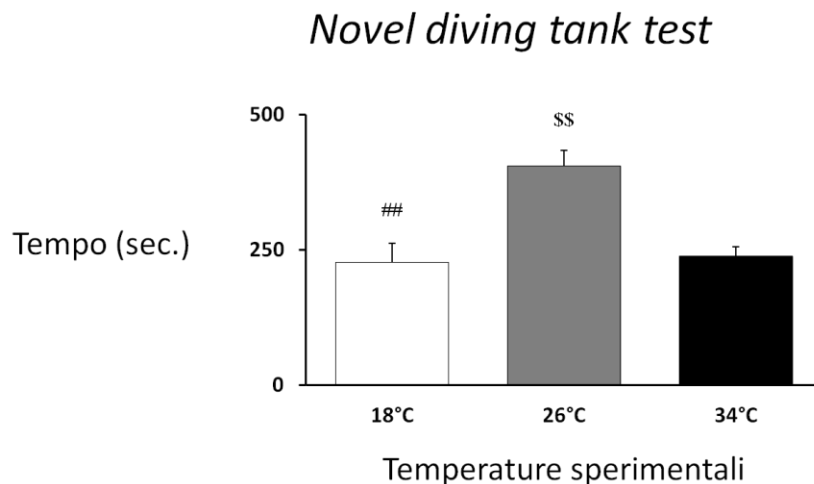


Fig. 3.25. Tempo trascorso nella parte bassa della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), \$\$ indica una differenza statistica tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

L'analisi intra-temperatura della presenza dei pesci nelle diverse zone della colonna d'acqua ha mostrato che i soggetti tenuti alla temperatura intermedia sono significativamente più presenti nella parte bassa e nel mezzo della vasca rispetto alla parte alta ($F_{2,48}=46,678$; $P<0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, si è trovata una differenza statisticamente significativa nel tempo trascorso nella parte alta della vasca da parte dei pesci zebra mantenuti a 18°C che negli ultimi due minuti di osservazione hanno trascorso un tempo maggiore in questa porzione rispetto al primo intervallo di tempo considerato ($F_{8,288}=4,201$; $P<0.01$) (Fig. 3.26).

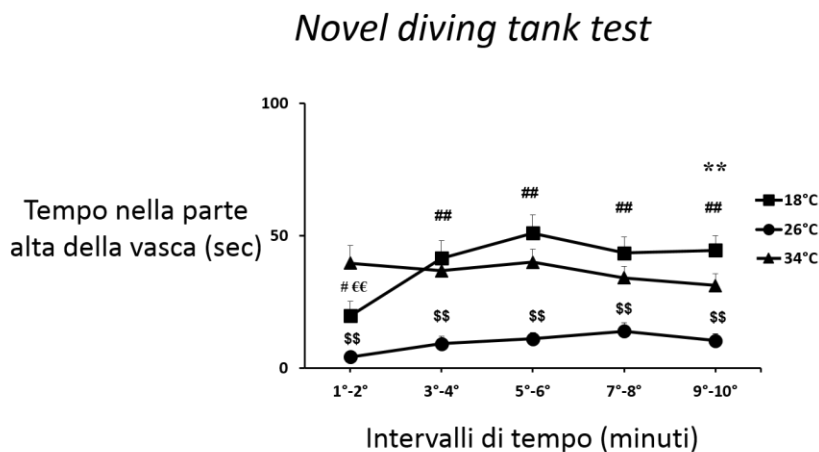


Fig. 3.26. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # e ## indicano una differenza significativa tra 18°C e 26°C (rispettivamente $P<0.05$ e $P<0.01$), €€ indica una differenza significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). ** indica una differenza significativa tra il tempo trascorso nella parte alta nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti negli animali mantenuti a 18°C ($P<0.01$). (n=25; N=75)

Mentre i pesci mantenuti a 26°C hanno trascorso un tempo maggiore nella parte bassa dell'acquario nei primi due minuti di osservazione rispetto agli ultimi ($F_{8,288}=2,381$; $P<0.05$).

Per quel che riguarda i comportamenti analizzati nel totale dei dieci minuti di osservazione è stato trovato un effetto della temperatura sui comportamenti di: *freezing* ($F_{2,72}=6,186$; $P<0.01$), *swimming* ($F_{2,72}=4,261$; $P<0.05$), *thrashing* ($F_{2,72}=10,933$; $P<0.01$) ed *erratic movements* ($F_{2,72}=3,913$; $P<0.05$). I confronti multipli hanno mostrato che i pesci mantenuti alla temperatura intermedia hanno trascorso un periodo di tempo statisticamente maggiore nell'attività di *freezing* rispetto agli animali tenuti a 34°C (Fig. 3.27) e un tempo maggiore nell'esibizione dell'*erratic movements* rispetto ai pesci provenienti dalla vasca mantenuta a 18°C (Fig. 3.28).

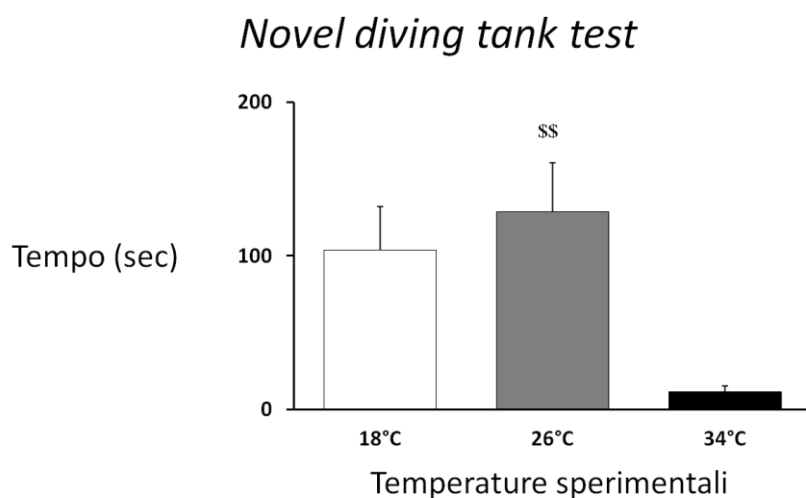


Fig. 3.27. Tempo trascorso nel comportamento di *freezing* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. \$\$ indica una differenza significativa tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

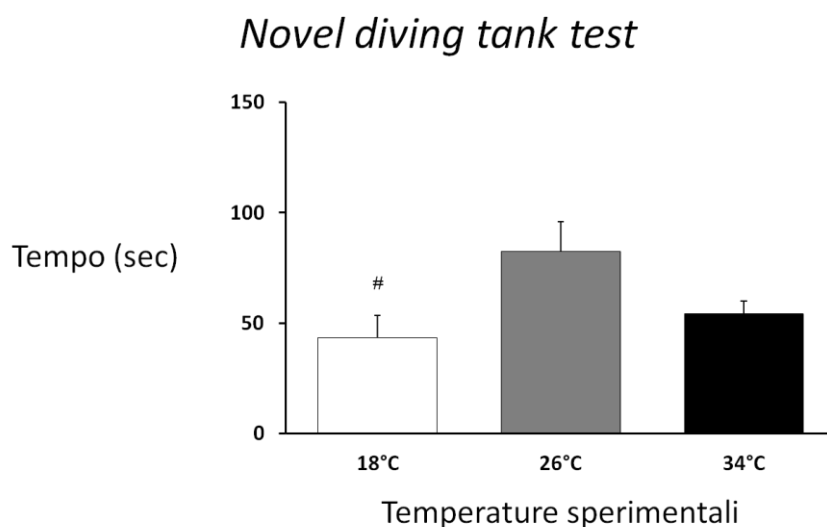


Fig. 3.28. Tempo trascorso nel comportamento di *erratic movements* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

Inoltre, i pesci stabulati nella vasca tenuta a 26°C trascorrono un minor tempo nell'attività dello *swimming* rispetto agli individui mantenuti nella condizione di temperatura più bassa (Fig. 3.29).

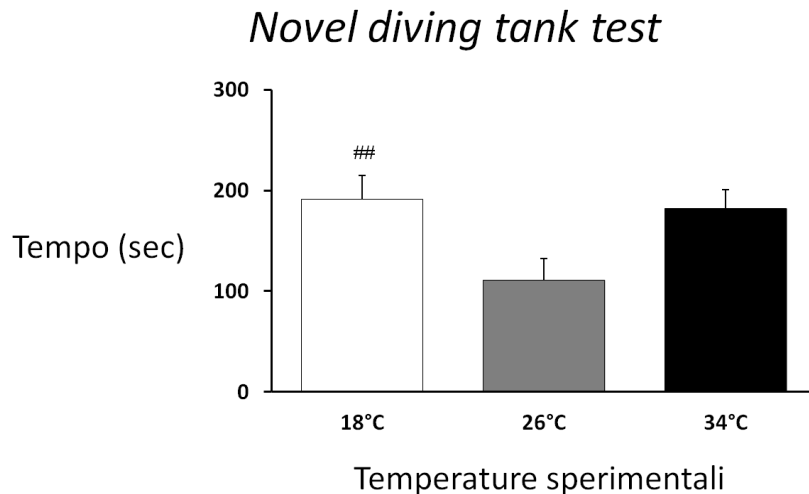


Fig. 3.29. Tempo trascorso nel comportamento di *swimming* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

Gli animali mantenuti alla temperatura sperimentale più alta trascorrono un periodo di tempo statisticamente maggiore nell'attività del *thrashing* rispetto ai pesci zebra acclimatati alle altre due temperature (Fig. 3.30).

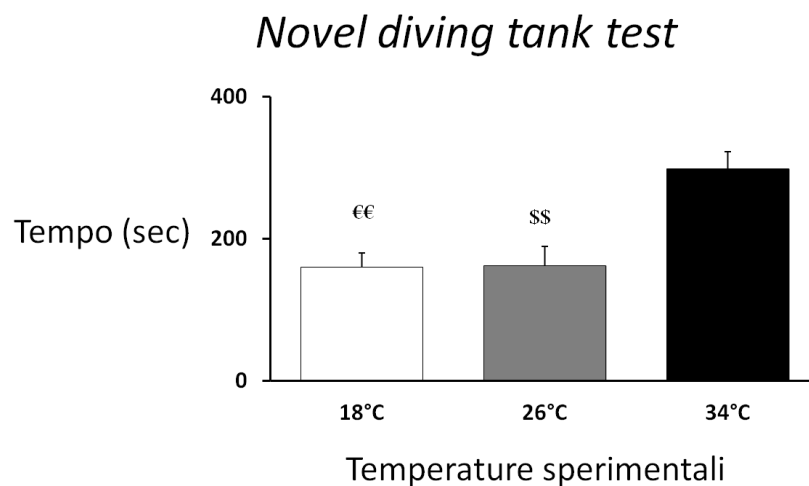


Fig. 3.30. Tempo trascorso nel comportamento di *thrashing* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). \$\$ indica una differenza statistica tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

L'analisi intra-temperatura di tutti i comportamenti considerati ha mostrato che, indipendentemente dalla condizione termica in cui si trovano, tutti i pesci trascorrono più tempo manifestando i comportamenti di *swimming* e *thrashing* rispetto agli altri comportamenti.

L'analisi del repertorio comportamentale svolta suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno, ha mostrato che i pesci tenuti per 21 giorni a 18°C hanno trascorso un tempo significativamente maggiore nell'attività di *freezing* ($F_{8,288}=2,733$; $P<0.01$) (Fig. 3.31) e un tempo significativamente minore nell'attività di *swimming* durante i primi due minuti di test rispetto agli ultimi due minuti di osservazione ($F_{8,288}=2,070$; $P<0.05$).

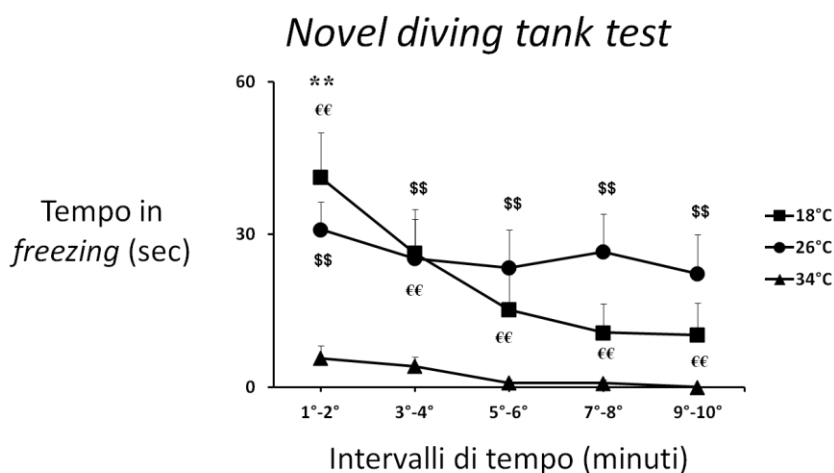


Fig. 3.31. Tempo trascorso nel comportamento di *freezing* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). ** indica una differenza significativa tra il tempo trascorso nel comportamento di *freezing* nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti negli animali mantenuti a 18°C ($P<0.01$). (n=25; N=75)

3.3.2 Dark/light preference test. Per quanto riguarda la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è stato suddiviso questo apparato sperimentale, è stato trovato un effetto principale della temperatura sia per quanto riguarda la durata del tempo trascorso nella zona nera ($F_{2,72}=15,663$; $P<0.01$) che in quella bianca ($F_{2,72}=15,637$; $P<0.01$). I confronti multipli mostrano che i pesci che sono stati tenuti per 21 giorni a 18 e 26°C hanno trascorso un periodo di tempo significativamente maggiore nella parte nera, rispetto ai soggetti tenuti alla temperatura sperimentale più alta (Fig. 3.32).

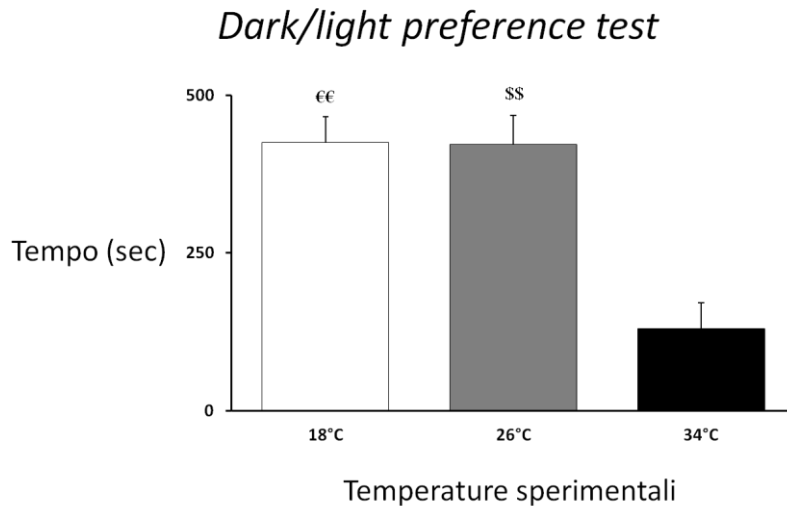


Fig. 3.32. Tempo trascorso nella zona nera dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

I pesci provenienti dalla vasca tenuta alla temperatura di 34°C hanno trascorso un intervallo di tempo significativamente maggiore nella parte bianca rispetto alle altre due temperature.

Per quanto riguarda il tempo trascorso nelle due zone in cui era stata divisa la parte bianca della vasca sperimentale (la zona bianca vicina le pareti della vasca e la zona bianca centrale) non si è proceduto all'analisi inter-temperatura della distribuzione degli animali poiché solo i pesci tenuti a 34°C hanno trascorso gran parte del tempo del test nella porzione bianca dell'acquario.

Poichè i comportamenti sono stati registrati solo per la porzione bianca della vasca, non si è condotta un'analisi statistica sulle loro variazioni dovute ai diversi trattamenti termici, essendo tutti compiuti in modo significativamente maggiore dai pesci mantenuti a 34°C. Eccezione fatta per il *freezing*, comportamento che è risultato essere espresso per un tempo significativamente maggiore dagli individui stabulati a 18°C rispetto ai pesci tenuti a 34°C ($F_{2,71}=3,356$; $P < 0.05$) (Fig. 3.33).

Dark/light preference test

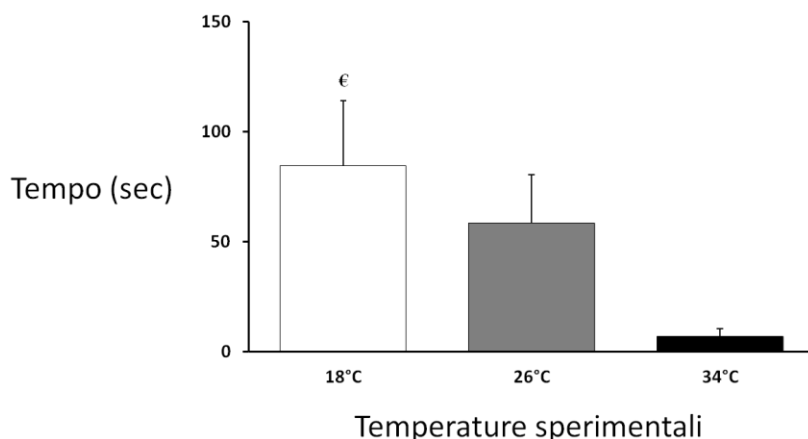


Fig. 3.33. Tempo trascorso nel comportamento di *freezing* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. € indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

L'analisi del *pattern* comportamentale esibito dai *Danio rerio* tenuti a 34°C ha mostrato una frequenza significativamente più alta delle attività di *thrashing* e *swimming* rispetto agli altri comportamenti presi in considerazione ($F_{5,115}=32,350$; $P < 0.01$) (Fig. 3.34).

Dark/light preference test

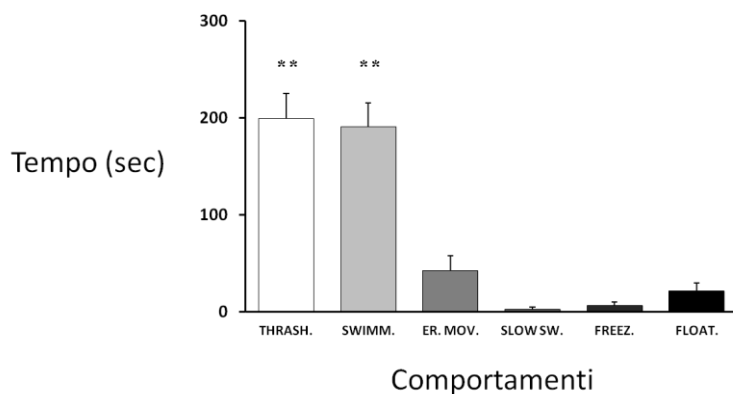


Fig. 3.34. Comportamenti effettuati dagli animali mantenuti a 34°C nella porzione di vasca bianca dopo 21 giorni di acclimatazione alla temperatura sperimentale. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ** indica una differenza statisticamente significativa tra i comportamenti del *thrashing* e dello *swimming* e gli altri ($P < 0.01$). (n=25)

La suddivisione della sessione sperimentale, lunga dieci minuti, in cinque intervalli da due minuti ciascuno ha mostrato un'unica differenza statisticamente significativa nel comportamento di *thrashing* espresso dagli animali mantenuti a 34°C, con un incremento di questa attività tra i primi due minuti di test e gli ultimi due ($F_{8,288}=7,261$; $P<0.01$) (Fig. 3.35).

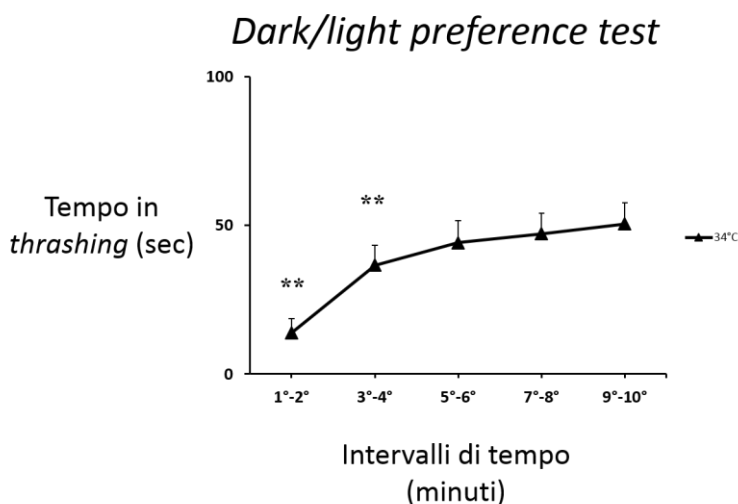


Fig. 3.35. Tempo trascorso nel comportamento di *thrashing* 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso in *thrashing* nei primi due intervalli rispetto al terzo, quarto e quinto intervallo di tempo considerato negli animali mantenuti a 34°C ($P<0.01$). (n=25)

3.3.3 Group preference test. In generale i pesci, indipendentemente dalla temperatura di mantenimento, hanno trascorso un intervallo di tempo significativamente maggiore nella metà vasca adiacente il gruppo di conspecifici rispetto alla metà vasca lontana dallo stimolo sociale (18°C: $F_{1,24}=509,481$; $P<0.01$; 26°C: $F_{1,24}=37,143$; $P<0.01$; 34°C: $F_{1,24}=171,162$; $P<0.01$).

Per quanto riguarda la presenza di *Danio rerio* nelle varie zone della vasca (vicino e lontano dal gruppo sociale) e lungo la colonna d'acqua (parte alta e bassa della vasca) nei dieci minuti del test è stato osservato un effetto della condizione termica sia per la presenza dei pesci nella parte superiore ($F_{2,72}=32,016$; $P<0.01$) e inferiore della vasca ($F_{2,72}=32,118$; $P<0.01$), sia per quanto riguarda la presenza nella parte vicina ($F_{2,72}=4,057$; $P<0.05$) e lontana ($F_{2,72}=4,100$; $P<0.05$) lo stimolo sociale (il gruppo). Dai confronti multipli è risultato che gli animali mantenuti alla temperatura sperimentale intermedia hanno trascorso un intervallo di tempo significativamente minore nella parte alta della vasca rispetto ai pesci tenuti alle altre due temperature (18 e 34°C) (Fig. 3.36).

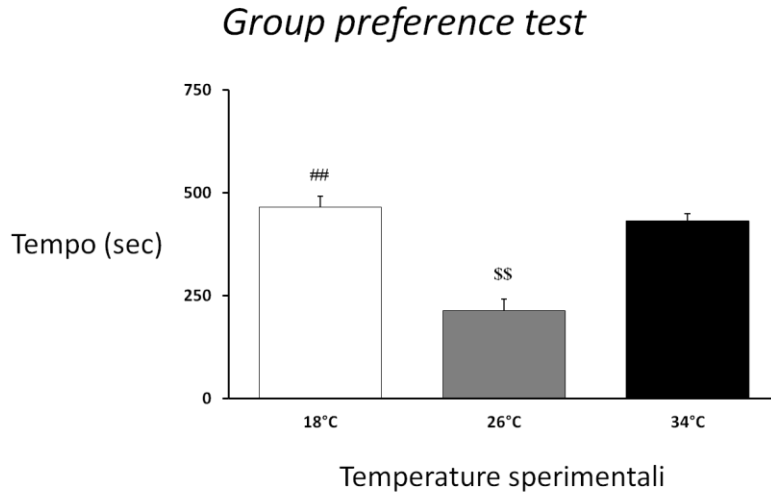


Fig. 3.36. Tempo trascorso nella parte alta dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media \pm SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

Inoltre, gli animali mantenuti alla temperatura più bassa passano nella porzione adiacente lo stimolo sociale un tempo significativamente maggiore rispetto i soggetti mantenuti a 26°C (Fig. 3.37).

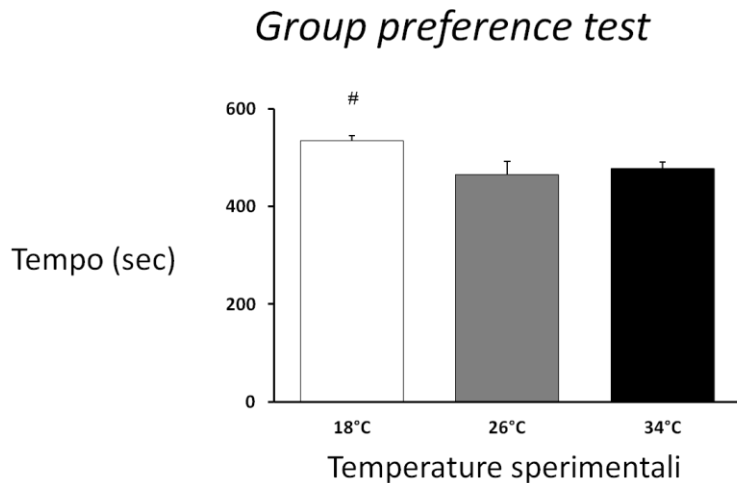


Fig. 3.37. Tempo trascorso nella zona adiacente lo stimolo sociale dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media \pm SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, si è osservato che i pesci mantenuti a 18°C

trascorrono nella porzione alta della vasca un intervallo di tempo statisticamente maggiore negli ultimi due minuti di test rispetto ai primi due minuti di osservazione ($F_{8,288}=7,982$; $P<0.01$) (Fig. 3.38).

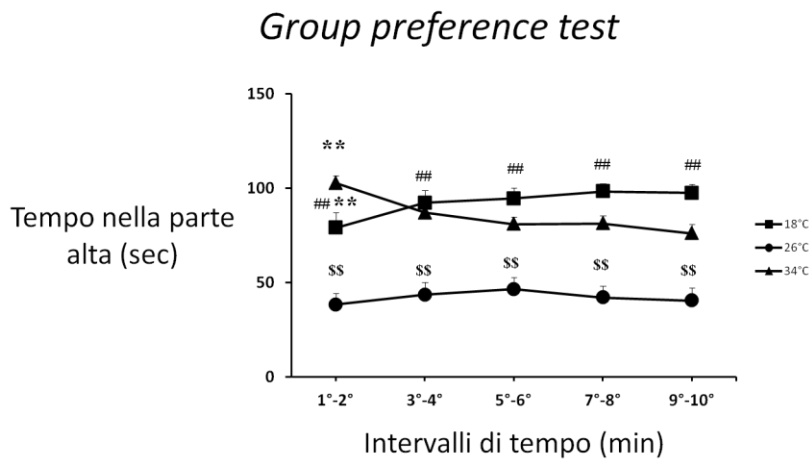


Fig. 3.38. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P<0.01$), \$\$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P<0.01$). ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso nella parte alta della vasca nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti sia nella temperatura di 18°C che di 34°C ($P<0.01$). (n=25; N=75)

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questa prova nel totale dei dieci minuti di osservazione si è trovato un effetto della temperatura sperimentale sui comportamenti di *swimming* ($F_{2,72}=9,419$; $P<0.01$) e *thrashing* ($F_{2,72}=5,481$; $P<0.01$). Infatti, gli animali tenuti a 34°C hanno effettuato per un tempo significativamente maggiore l'attività di *swimming* in confronto ai pesci mantenuti a 18°C (Fig. 3.39), mentre questi ultimi hanno trascorso più tempo nell'attività di *thrashing* se confrontati con i pesci mantenuti alla temperatura sperimentale più alta (Fig. 3.40).

Nell'analisi intra-temperatura del tempo trascorso nell'esibizione dei vari comportamenti considerati tutti i pesci, indipendentemente dalla condizione termica in cui si trovavano, hanno speso più tempo esibendo il comportamento di *thrashing* e *swimming* (18°C: $F_{5,120}=157,687$; $P<0.01$; 26°C: $F_{5,120}=37,428$; $P<0.01$; 34°C: $F_{5,120}=70,556$; $P<0.01$), rispetto agli altri comportamenti analizzati.

L'espressione dei diversi comportamenti non ha mostrato differenze significative quando i dieci minuti di test sono stati suddivisi in 5 intervalli da due minuti ciascuno.

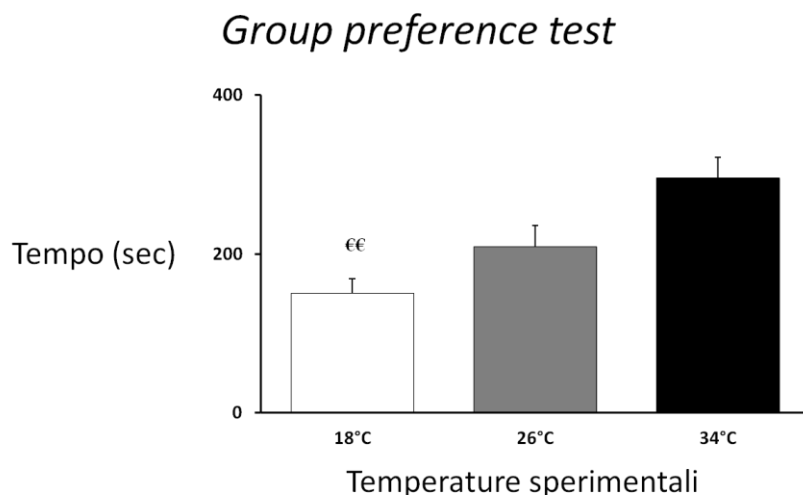


Fig. 3.39. Tempo trascorso nel comportamento di *swimming* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ** indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

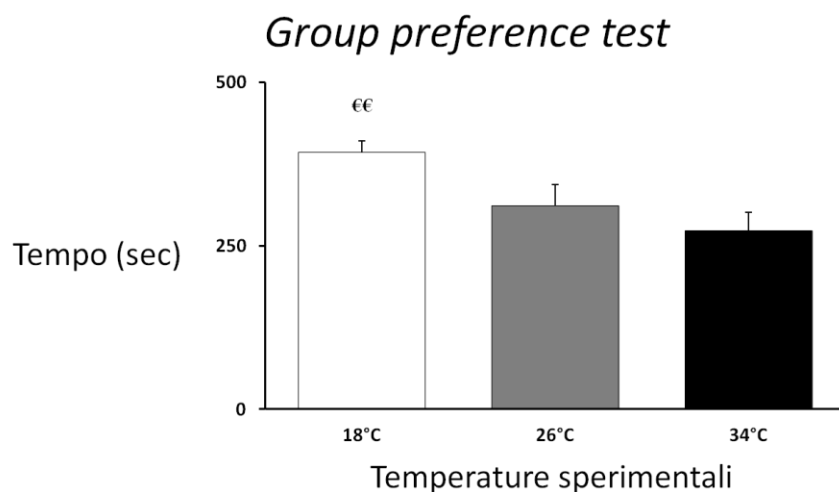


Fig. 3.40. Tempo trascorso nel comportamento di *thrashing* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ** indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

3.3.4 Mirror test. Per quanto riguarda la presenza degli animali nelle varie zone della vasca è stato osservato un effetto della condizione termica solo nella zona dello specchio più vicina alla vasca (*near mirror*, in cui l'immagine del pesce risulta più vicina). I pesci zebra mantenuti a 34°C trascorrono in questa porzione di vasca un tempo significativamente maggiore rispetto ai pesci tenuti a 26°C ($F_{2,72}=3,643$; $P < 0.05$) (Fig. 3.41).

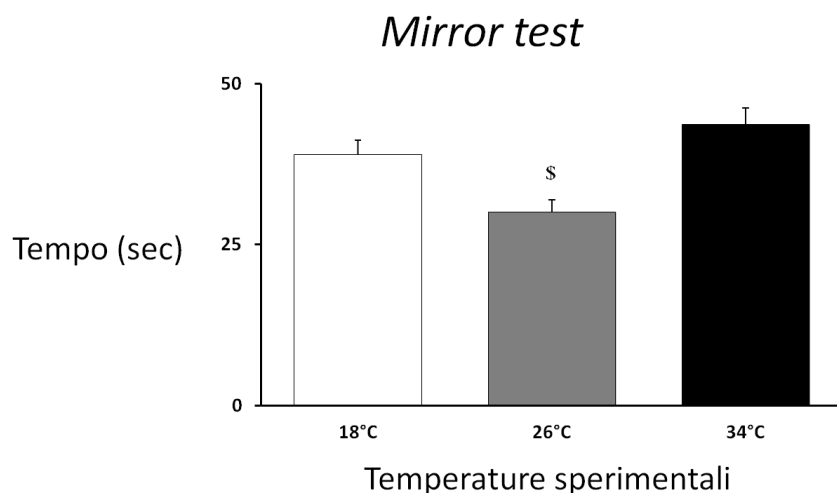


Fig. 3.41. Tempo trascorso nella parte più vicina dello specchio dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media \pm SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. \$ indica una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

Nell'analisi della distribuzione degli animali intra-temperatura si può osservare che tutti gli animali, indipendentemente dal trattamento termico cui sono stati sottoposti, trascorrono un tempo significativamente maggiore nella porzione di vasca dove è presente lo specchio (*mirror zone*) (analizzato nel suo insieme quindi senza la distinzione *near mirror* e *distant mirror*) rispetto alla porzione di acquario in cui non è presente lo specchio (*no mirror*) (18°C: $F_{2,48}=48,431$; $P < 0.01$; 26°C: $F_{2,48}=35,734$; $P < 0.01$; 34°C: $F_{2,48}=38,891$; $P < 0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, non si osservano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questo test nel totale dei dieci minuti di osservazione l'unica significatività si rileva nel comportamento di *slow swimming*, poiché gli animali che sono stati tenuti per 21 giorni a 18°C effettuano questo comportamento per un tempo significativamente maggiore se confrontato con le altre due temperature ($F_{2,72}=7,788$; $P < 0.01$) (Fig. 3.42).

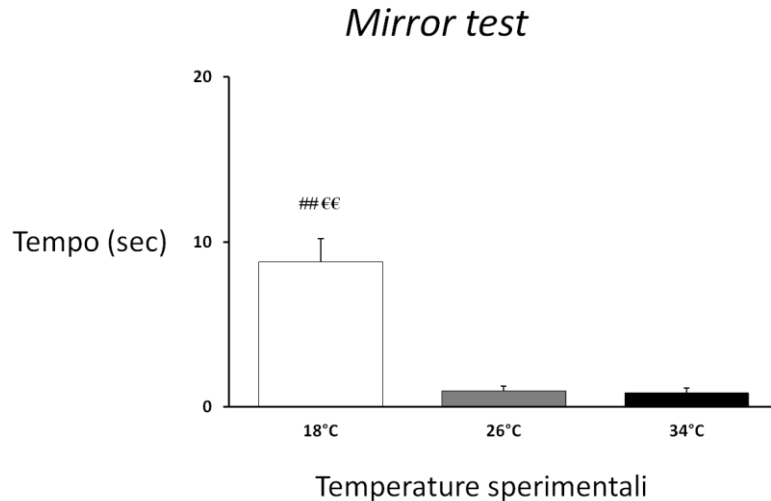


Fig. 3.42. Tempo trascorso nel comportamento di *slow swimming* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ## indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.01$), €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n=25; N=75)

L'analisi dell'espressione dei comportamenti intra-temperatura, ha mostrato che in tutti i trattamenti termici gli animali hanno effettuato il comportamento di *swimming* in modo significativamente maggiore rispetto alle altre attività (18°C: $F_{6,144}=21,398$; $P < 0.01$; 26°C: $F_{6,144}=30,180$; $P < 0.01$; 34°C: $F_{6,144}=22,005$; $P < 0.01$).

In nessuna delle tre temperature è stata trovata una differenza statisticamente significativa nella durata con cui i singoli comportamenti sono stati espressi nei cinque intervalli da due minuti ciascuno in cui si sono, successivamente, divisi i dieci minuti di test.

3.3.5 Peso degli animali. Per quel che riguarda il peso degli animali si può osservare una differenza significativa tra le differenti temperature sperimentali ($F_{2,107}=2,967$; $P < 0.05$). In particolare dai confronti multipli si può notare come il peso dei pesci mantenuti a 18°C sia statisticamente maggiore del peso degli animali tenuti alla temperatura di 26°C (Fig. 3.43).

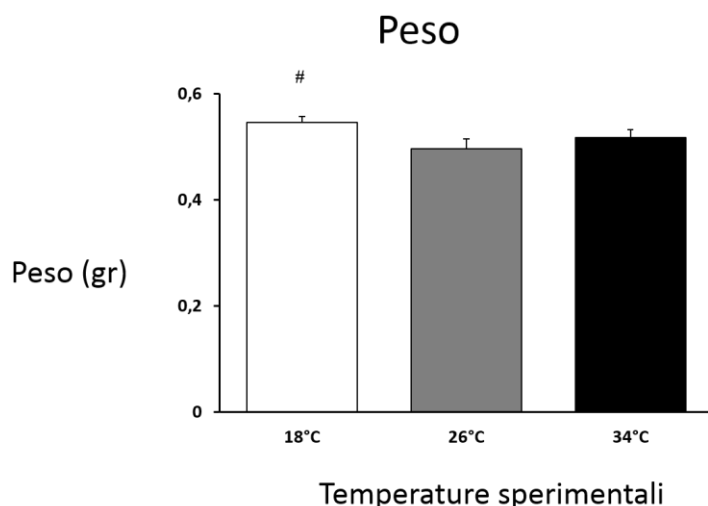


Fig. 3.43. Peso del pesce zebra *wild-type* linea commerciale dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. # indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 26°C ($P < 0.05$). (n=25; N=75)

3.4 Trattamento termico di lungo periodo in *Danio rerio wild-type* linea AB

3.4.1 Novel diving tank test. Nel totale dei dieci minuti di osservazione si nota un effetto della temperatura per quanto riguarda la presenza degli animali in due delle tre zone in cui è stata suddivisa la colonna d'acqua. Infatti la temperatura influenza l'utilizzo della parte superiore della vasca ($F_{2,42}=5,275$; $P < 0.01$) e della parte intermedia ($F_{2,42}=4,793$; $P < 0.05$). Dai confronti multipli risulta che gli animali mantenuti alla temperatura più elevata (34°C) hanno trascorso un maggior tempo nella parte alta della vasca rispetto ai soggetti sperimentali provenienti dalla vasca tenuta a 18°C (Fig. 3.34).

Ancora, i confronti multipli mostrano che gli animali tenuti per 21 giorni alla temperatura più bassa (18°C) hanno trascorso un intervallo significativamente maggiore nella parte intermedia della vasca rispetto ai pesci tenuti alla temperatura sperimentale di 34°C (Fig. 3.45).

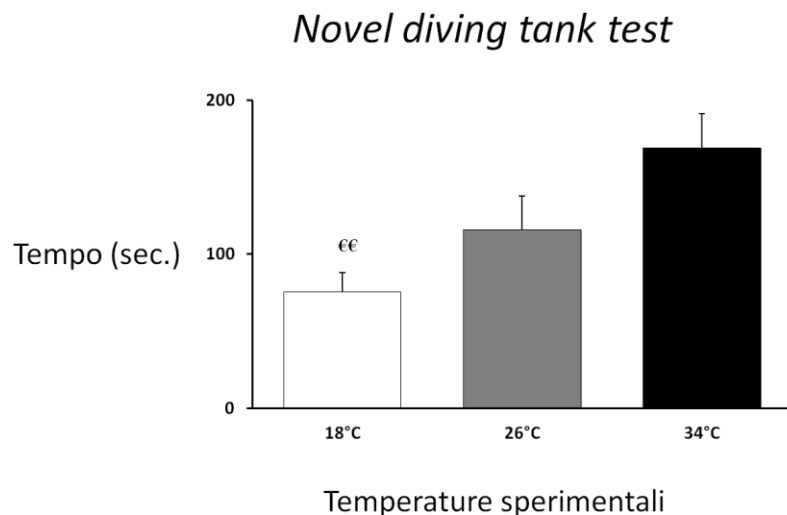


Fig. 3.44. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. ** indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.01$). (n18°C=16, n26°C=17, n34°C=12; N=45)

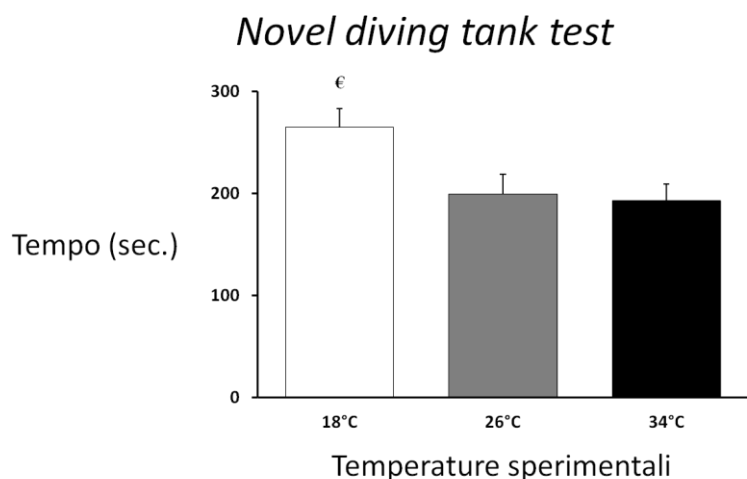


Fig. 3.45. Tempo trascorso nella parte intermedia della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. * indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.05$). (n18°C=16, n26°C=17, n34°C=12; N=45)

L'analisi dell'utilizzo della colonna d'acqua all'interno di ogni singola temperatura sperimentale ha mostrato che solo gli animali tenuti per 21 giorni alle due temperature sperimentali di 18 e 26°C hanno frequentato in maniera significativamente maggiore il fondo della vasca (18°C: $F_{2,30}=22,859$; $P < 0.01$; 26°C: $F_{2,32}=8,892$; $P < 0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, si osserva che la presenza nella parte alta della vasca dei pesci mantenuti sia a 26°C che a 34°C aumenta in modo significativo negli ultimi due minuti di osservazione in confronto ai primi due minuti ($F_{8,168}=1,960$; $P<0.05$) (Fig. 3.46).

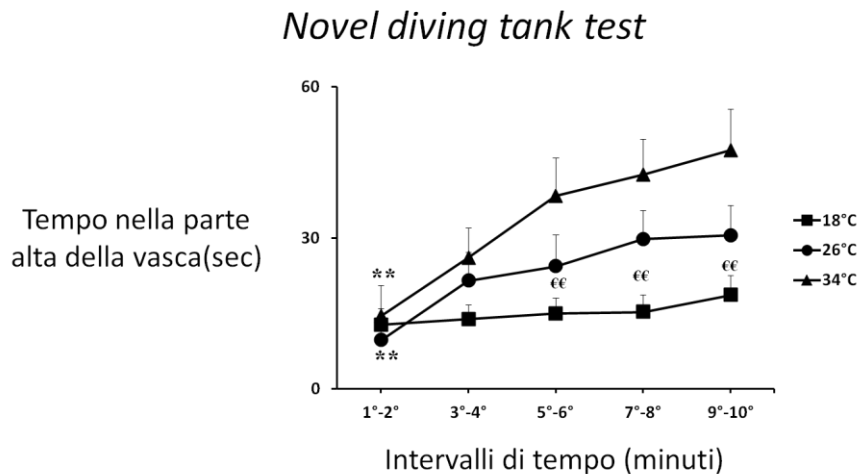


Fig. 3.46. Tempo trascorso nella parte alta della vasca dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. €€ indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.01$). ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso nella parte alta della vasca nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti nelle due temperature di 26°C e 34°C ($P<0.01$). (n18°C=16, n26°C=17, n34°C=12; N=45)

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questo test si può osservare un effetto della temperatura di mantenimento solo sul comportamento di *swimming* ($F_{2,42}=3,627$; $P<0.05$). Dai confronti multipli risulta che i pesci tenuti alla temperatura minore (18°C) hanno trascorso un periodo significativamente maggiore esibendo il comportamento di *swimming* rispetto agli animali mantenuti a 34°C (Fig. 3.47).

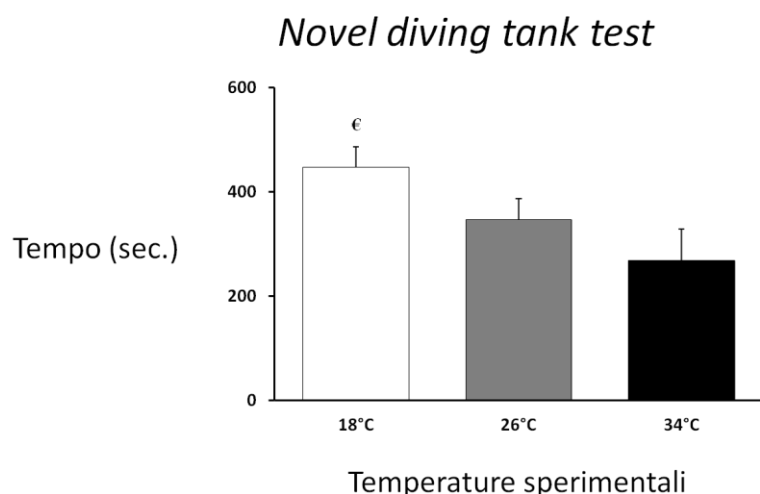


Fig. 3.47. Tempo trascorso nel comportamento di *swimming* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. *e* indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P < 0.05$). ($n_{18^\circ\text{C}}=16$, $n_{26^\circ\text{C}}=17$, $n_{34^\circ\text{C}}=12$; $N=45$)

Nell'analizzare i comportamenti intra-temperatura si può notare come i pesci tenuti alle condizioni sperimentali di 18°C e 26°C abbiano trascorso un intervallo di tempo significativamente maggiore nel comportamento di *swimming* rispetto agli altri comportamenti presi in considerazione (18°C: $F_{5,75}=51,991$; $P < 0.01$; 26°C: $F_{2,32}=8,892$; $P < 0.01$), mentre gli animali mantenuti a 34°C abbiano trascorso un intervallo di tempo significativamente maggiore sia nel comportamento di *swimming* che in quello di *thrashing* ($F_{5,55}=6,352$; $P < 0.01$).

Analizzando i comportamenti degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si osserva nessuna differenza statisticamente significativa.

3.4.2 Dark/light preference test. Per quanto riguarda la distribuzione degli animali nei due comparti in cui è divisa questa vasca nel totale dei dieci minuti di osservazione non si rileva nessun effetto principale della temperatura sulla scelta delle due zone bianca e nera di questa vasca comportamentale. Anche per il tempo trascorso nella parte bianca vicino la parete e la parte bianca centrale non si rilevano effetti della temperatura di mantenimento.

Solo nell'analisi intra-temperatura si rileva che gli animali acclimatati per 21 giorni alle tre differenti condizioni termiche hanno preferito la porzione bianca vicino la parete piuttosto che la porzione bianca centrale (18°C: $F_{1,14}=10,067$; $P < 0.01$; 26°C: $F_{1,16}=11,010$; $P < 0.01$; 34°C: $F_{1,11}=6,764$; $P < 0.05$).

Analizzando la distribuzione degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si osserva nessuna differenza statisticamente significativa.

In questo test i comportamenti sono stati analizzati per la sola porzione bianca, l'unica visibile, e nel totale dei dieci minuti nessun comportamento risulta influenzato dalla temperatura di mantenimento.

Solo nell'analisi dei comportamenti intra-temperatura si rileva che gli animali esposti per 21 giorni alle tre differenti condizioni termiche hanno trascorso più tempo nell'attività di *swimming* rispetto agli altri comportamenti analizzati (18°C: $F_{4,56}=31,041$; $P<0.01$; 26°C: $F_{4,64}=10,107$; $P<0.01$; 34°C: $F_{4,44}=5,346$; $P<0.01$).

Analizzando il comportamento degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si rilevano differenze statisticamente significative.

3.4.3 Group preference test. Per quanto riguarda la presenza degli animali nelle varie zone della vasca (vicino e lontano dal gruppo sociale) e lungo la colonna d'acqua (parte superiore e inferiore della vasca) nei dieci minuti del test non è stato trovato un effetto della condizione termica.

Nel fare un'analisi intra-temperatura della distribuzione dei pesci nelle diverse zone della vasca si osserva che, indipendentemente dal trattamento termico cui erano sottoposti, tutti gli animali trascorrono un intervallo di tempo significativamente maggiore nella metà vasca adiacente il gruppo di tre pesci (18°C: $F_{1,15}=53,900$; $P<0.01$; 26°C: $F_{1,16}=23,286$; $P<0.01$; 34°C: $F_{1,11}=18,775$; $P<0.01$).

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, non si osservano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questa prova nei dieci minuti di test non si osserva nessun effetto della temperatura sperimentale.

Nel fare un'analisi intra-temperatura, tutti gli animali, indipendentemente dal trattamento termico cui erano sottoposti, mostrano di trascorrere in modo significativamente maggiore il tempo nel comportamento di *swimming* (18°C: $F_{4,60}=176,440$; $P<0.01$; 26°C: $F_{4,64}=75,905$; $P<0.01$; 34°C: $F_{4,44}=19,062$; $P<0.01$) rispetto agli altri comportamenti analizzati.

Analizzando il comportamento degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno non si rilevano differenze statisticamente significative.

3.4.4 Mirror test. Per quanto riguarda la presenza degli animali nelle varie zone della vasca nel totale dei dieci minuti di osservazione non è stato osservato nessun effetto della condizione termica.

Nel fare un'analisi intra-temperatura della distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è stata suddivisa questa vasca non si osserva nessun effetto della condizione termica.

Nell'analizzare la distribuzione degli animali nelle diverse zone in cui è suddivisa la vasca considerando cinque intervalli da due minuti ciascuno, non si osservano differenze statisticamente significative.

Per quanto riguarda i comportamenti esibiti in questo test, nel totale dei dieci minuti di osservazione, l'unica significatività osservata è nel comportamento dell'*erratic movements* poiché gli animali che sono stati tenuti per 21 giorni a 34°C effettuano questo comportamento per un tempo significativamente maggiore se confrontato con i pesci mantenuti a 18°C ($F_{2,42}=3,965$; $P<0.05$) (Fig. 3.48).

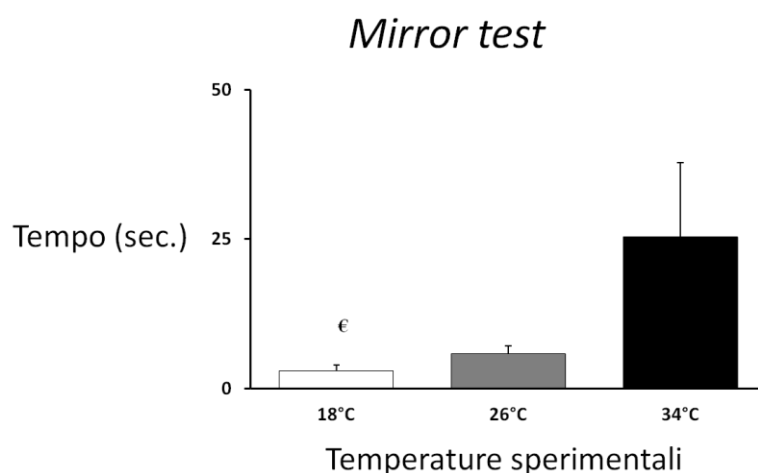


Fig. 3.48. Tempo trascorso nel comportamento dell'*erratic movements* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. € indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.05$). (n18°C=16, n26°C=17, n34°C=12; N=45)

Nel fare un'analisi intra-temperatura dei comportamenti esibiti dai pesci, si può osservare che in tutti i trattamenti termici gli animali effettuano il comportamento di *swimming* in modo significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri (18°C: $F_{6,96}=30,641$; $P<0.01$; 26°C: $F_{6,90}=40,725$; $P<0.01$; 34°C: $F_{6,66}=18,333$; $P<0.01$).

Nell'analizzare il comportamento degli animali suddividendo i dieci minuti di test in cinque intervalli da due minuti ciascuno si osserva una differenza significativa nel comportamento dell'*erratic movements* per gli animali mantenuti a 34°C, i quali trascorrono un intervallo di tempo maggiore nell'esibire questo comportamento nei primi due minuti del test rispetto agli ultimi due minuti ($F_{8,168}=2,275$; $P<0.05$) (Fig. 3.49).

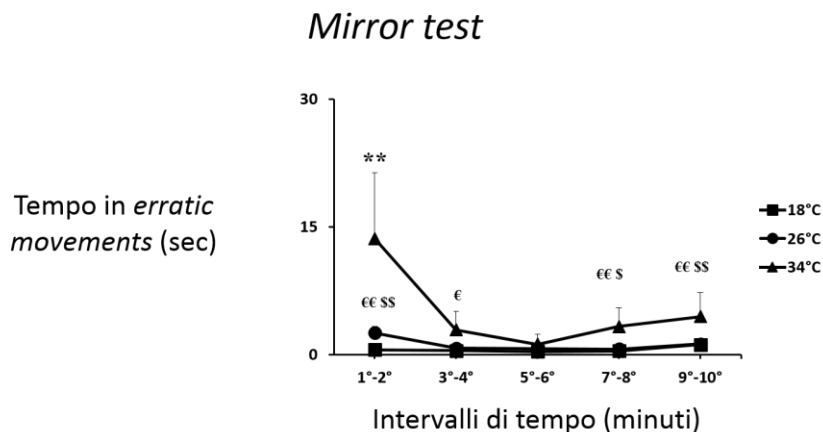


Fig. 3.49. Tempo trascorso nel comportamento dell'*erratic movements* dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test post-hoc di Tukey. € e €€ indicano una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C (rispettivamente $P<0.05$ e $P<0.01$); \$ e \$\$ indicano una differenza statisticamente significativa tra 26°C e 34°C (rispettivamente $P<0.05$ e $P<0.01$). ** indica una differenza statisticamente significativa tra il tempo trascorso nel comportamento di *erratic movements* nei primi due minuti rispetto agli ultimi due minuti nella temperatura di 34°C ($P<0.01$). (N18°C=16, N26°C=17, N34°C=12; n=45)

3.4.5 Peso degli animali. Per quel che riguarda il peso degli animali si può osservare una differenza statisticamente significativa tra le tre differenti temperature sperimentali ($F_{2,38}=5,364$; $P<0.01$). In particolare dai confronti multipli è risultato che il peso dei pesci mantenuti a 18°C è statisticamente maggiore del peso degli animali tenuti a 34°C (Fig. 3.50).

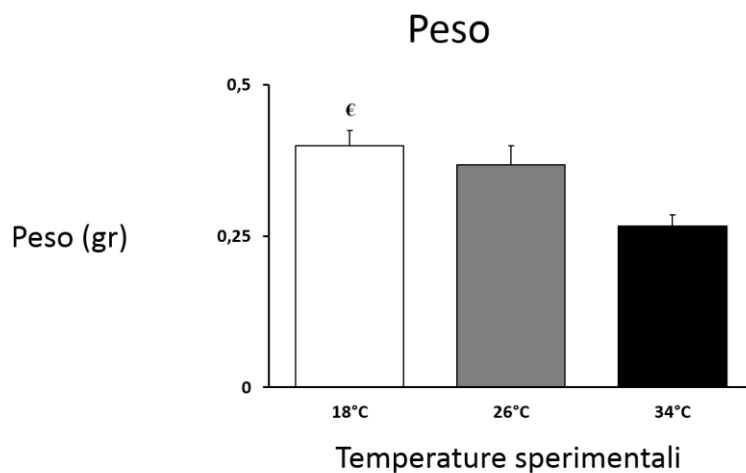


Fig. 3.50. Peso del pesce zebra linea *wild-type* AB dopo 21 giorni di acclimatazione alle tre temperature sperimentali. I valori sono espressi in media + SE. Il confronto statistico tra le medie è stato effettuato mediante ANOVA seguita dal test *post-hoc* di Tukey. € indica una differenza statisticamente significativa tra 18°C e 34°C ($P<0.05$). (n18°C=16, n26°C=17, n34°C=12; N=45)

4 DISCUSSIONE

4.1 *Dicentrarchus labrax*

La spigola è una specie estremamente resistente alle variazioni di temperatura, infatti tollera variazioni comprese tra 2 e 30° C. In questa specie si è visto che la temperatura influenza l'attività di nuoto (Claireaux *et al.*, 2006), modifica il tasso metabolico (Claireaux *et al.*, 2006), lo sviluppo ontogenetico (Koumoundouros *et al.*, 2001) e il rapporto tra i sessi (Pavlidis *et al.*, 2000). Pur essendo una specie euriterma, variazioni di temperatura rapide ed elevate possono rappresentare un fattore limitante per la sua crescita, fino ad arrivare a minacciarne la sopravvivenza. Attualmente scarse sono le informazioni sulle variazioni del comportamento esibite da questa specie in risposta a cambiamenti della temperatura dell'acqua in cui vivono.

4.1.1 Trattamento termico di lungo periodo

I risultati trovati in questo lavoro indicano che le condizioni termiche influiscono su alcuni aspetti del comportamento della spigola. Dopo tre settimane di trattamento termico (18, 22 e 28°C) il comportamento di *feeding* non ha subito modifiche, mentre i comportamenti di *fin raising* e *fast swimming* sono chiaramente influenzati dalla temperatura di mantenimento. Infatti, le spigole mantenute per 21 giorni alla temperatura di 28°C hanno mostrato un incremento in questi due comportamenti in due test, riguardanti uno la presenza di prede vive e l'altro uno stimolo olfattivo di natura alimentare. Inoltre, gli eventi di *fin raising* sono aumentati linearmente attraverso i tre trattamenti termici, andando dal numero maggiore di eventi effettuati dagli animali tenuti a 28°C fino al numero di eventi minore effettuati dalle spigole acclimatate a 18°C.

Alcuni autori sostengono che questi due comportamenti nelle spigole possono essere associati alle situazioni di foraggiamento (Pickett e Pawson, 1994), rappresentando una risposta alla presenza di cibo. Questo è in linea con ciò che si conosce dalla letteratura di questa specie, ossia che alte temperature sono correlate ad un incremento della domanda di cibo (Claireaux e Lagardere, 1999; Peres e Oliva-Teles, 1999; Person-Le Ruyet *et al.*, 2004). Il peso maggiore riscontrato in questo studio, misurato in un sotto-campione di pesci, delle spigole acclimatate a 28°C potrebbe aver influenzato il comportamento di questi animali in presenza di cibo, anche se non sono stati osservati effetti legati alla temperatura di mantenimento sul consumo di cibo e nella latenza al *first biting* (al primo atto di predazione) nel test di foraggiamento. Inoltre, anche un aumento delle attività generali dovuto ad un incremento della temperatura potrebbe essere una spiegazione ai risultati ottenuti in questo studio. In questo senso, la risposta di fuga più rapida osservabile nei pesci mantenuti a 28°C

può essere spiegata da una generale maggiore ricettività nei confronti dell'ambiente (Manciocco *et al.*, 2015).

Indipendentemente dalla temperatura di acclimatazione a cui erano tenuti, tutti i pesci di questo studio hanno mostrato una risposta di paura all'oggetto gettato nella vasca sperimentale, confermando che la risposta di fuga è una componente comportamentale innata del loro repertorio di difesa (Manciocco *et al.*, 2015).

In questo studio la reazione all'immagine riflessa dallo specchio è stata usata per valutare la risposta sociale delle spigole in funzione della temperatura. Il paradigma dello specchio è stato ampiamente utilizzato negli studi riguardanti i pesci e i contesti in cui è stato impiegato sono quelli inerenti l'ispezione del predatore (Bisazza *et al.*, 1999; Milinski, 1987) e gli incontri agonistici (Bronstein, 1985a,b; Meliska *et al.*, 1980). Nei pesci i contesti in cui la risposta di *C-start reaction* è stata osservata sono principalmente quelli di caccia e cattura delle prede (Canfield e Rose, 1993). Gli animali nel presente studio hanno mostrato una *latency to the contact with the mirror* relativamente alta, suggerendo che le spigole mostrano una sorta di cautela nell'approcciare con lo specchio, in particolare quelle mantenute alla condizione termica maggiore. I pesci alla condizione termica intermedia, invece, hanno mostrato un maggior interesse verso lo specchio, interagendo con lo stimolo più velocemente e per un periodo di tempo più lungo rispetto alle altre due temperature. Inoltre, le spigole acclimate alla temperatura intermedia hanno anche esibito un numero più alto di *C-start reaction* e una maggior durata dell'*arousal*. Infatti questi animali hanno effettuato per un periodo di tempo più lungo comportamenti quali nuoto a zig-zag rivolto verso lo specchio, apertura e chiusura della bocca e movimenti della pinna dorsale di fronte lo specchio. Queste osservazioni indicano uno stato generale di eccitazione e interesse dovuti allo stimolo proposto e riconducibili, molto probabilmente, ad un comportamento agonistico (Manciocco *et al.*, 2015; Pickett e Pawson, 1994). In alcuni studi presenti in letteratura sono stati interpretati come comportamenti aggressivi anche risposte comportamentali verso lo specchio come l'estensione delle branchie e morsi (Meliska *et al.*, 1980). In questo studio non è stato possibile misurare la distensione degli opercoli branchiali, spesso associati con il comportamento agonistico delle spigole (Pickett e Pawson, 1994), poiché i repentini movimenti dei pesci non permettevano la visione delle branchie per tutta la durata del test.

In molti studi è stato possibile osservare un'eccellente tasso di crescita e un'ottima efficienza di conversione del cibo nelle spigole mantenute a 22°C, se confrontate con animali tenuti a temperature più basse (16°C) o più alte (29°C) (Gardeur *et al.*, 2001; Pichavant *et al.*, 2001; Person-

Le Ruyet *et al.*, 2004). In linea con questi studi, la maggiore risposta allo stimolo dello specchio nelle spigole acclimatate a 22°C qui osservata, può rappresentare una misura indiretta di un buono stato di salute di questi pesci, espresso come una maggiore propensione alle interazioni sociali, inclusi i *display* aggressivi e/o di paura.

I pesci acclimatati a 28°C hanno mostrato un peso maggiore delle spigole mantenute alle temperature di 22°C e 18°C, nonostante questo dato sia stato ottenuto da un sotto-campione proveniente dai differenti gruppi sperimentali. È noto che le dimensioni corporee influenzano il comportamento aggressivo e competitivo se le fonti di cibo sono severamente limitate (Knights, 1987). In questo studio la scarsità di nutrimento non può esser considerata una condizione sperimentale, poichè i pesci erano mantenuti ad un regime alimentare tale da non far nascere accese competizioni per la risorsa cibo; inoltre, il comportamento competitivo dimensioni-dipendente non può esser considerato poichè le coppie di pesci erano simili nelle dimensioni corporee per ogni prova sperimentale. Il comportamento aggressivo era indirettamente analizzato nel *mirror test* poichè il riflesso dello specchio ha indotto una risposta negli animali. Ma anche in questo caso non ci sono evidenze che le dimensioni corporee influenzano i comportamenti osservati. Saranno necessari ulteriori studi per chiarire l'effetto della dimensione corporea sul comportamento di spigole acclimatate a differenti trattamenti termici (Manciocco *et al.*, 2015).

I risultati ottenuti con questo studio suggeriscono che la temperatura dell'acqua esercita una certa influenza sul comportamento dei giovanili di spigola. In questo lavoro gli animali sono stati esposti alle tre differenti condizioni termiche per 21 giorni, quindi una acclimatazione che dovrebbe esser considerata come un lungo periodo. Dato il valore commerciale delle spigole e la diffusione di sistemi di allevamento in cui questa specie è presente, questi effetti hanno bisogno di esser monitorati. I dati raccolti in questo studio possono esser un aiuto nel contesto dell'acquacoltura, per esempio nei sistemi di allevamento a gabbie flottanti o nella vallicoltura, in cui gli animali non possono migrare verso acque dalla temperatura più idonea.

Essendo le spigole molto importanti per l'economia di gran parte dei paesi del Mediterraneo analizzare le variazioni dei comportamenti legati alla loro sopravvivenza (come la capacità di alimentarsi, di reagire ai disturbi e le modifiche della loro socialità) rappresenta un passo nello sviluppare delle tecniche di monitoraggio negli allevamenti che ci diano informazioni sul loro stato di benessere in condizioni ambientali poco adatte alle loro esigenze.

4.2 *Danio rerio*

Il pesce zebra può essere classificato come organismo euritermico, che esibisce un intervallo di tolleranza alla temperatura ampio. Dati ottenuti da esperimenti di laboratorio indicano come massimo range di tolleranza di questa specie quello compreso tra 6,7 e 41,7°C (Cortemeglia e Beitinger, 2005; Schaefer e Ryan, 2006). In natura è stato possibile osservare questa specie in acque con temperature che variavano dai 6°C in inverno ai 38°C in estate (Spence *et al.*, 2008). Normalmente, si preferisce allevarlo a 28-28.5°C, temperatura a cui il *Danio rerio* mostra un aumento nella crescita (Lawrence, 2007; Schaefer e Ryan, 2006), anche se in cattività è stato mantenuto per lunghi periodi a temperature comprese tra 22° e 30°C (Matthews *et al.*, 2002). In letteratura è noto che la condizione termica influenza l'attività locomotoria del danio zebrato, con pesci più attivi quando mantenuti in vasche a temperature maggiori (Pritchard *et al.*, 2001).

4.2.1 Trattamento termico di breve periodo dei *wild-type* linea commerciale

Dai risultati ottenuti in questo studio si può osservare che già dopo quattro giorni di trattamento termico ci sia un'influenza della temperatura sia sulla distribuzione spaziale degli animali sia nei comportamenti esibiti nei diversi test comportamentali condotti.

In questo trattamento di breve periodo sono stati condotti due test ampiamente impiegati in letteratura per studi di ansia e stress, quali il *novel diving tank* e il *dark/light preference* e un test per studiare la socialità degli animali, il *group preference*, e in tutti i test i pesci provenienti dai tre trattamenti termici mostrano un'influenza della temperatura sul comportamento.

Nel test del *novel diving tank* i pesci mantenuti a 18°C trascorrono un periodo di tempo maggiore nella parte bassa della vasca rispetto agli animali provenienti dalle altre due condizioni termiche, mentre i pesci mantenuti alle due temperature più alte trascorrono un tempo maggiore nella parte intermedia rispetto ai *Danio rerio* acclimatati alla condizione di ipotermia. Inoltre, i pesci acclimatati alla temperatura più alta hanno trascorso un periodo di tempo maggiore nella parte alta rispetto agli animali provenienti dalla vasca mantenuta a 18°C.

I comportamenti che in questo test hanno subito un'influenza della temperatura sono l'attività del *freezing* e dello *swimming*. I pesci mantenuti alla temperatura più bassa effettuano per un periodo maggiore il comportamento di *freezing* e per un periodo minore il comportamento dello *swimming* rispetto agli animali provenienti dalle altre condizioni termiche.

Dalla letteratura emerge che, in questo particolare test comportamentale, il tempo speso nella parte alta della vasca è interpretato come un basso livello di ansia, così come una prolungata attività di

nuoto (Cachat *et al.*, 2010). Infatti, animali che riflettono un maggior livello di ansia o stress sono caratterizzati da un'elevata attività di *erratic movements* e/o di *freezing* e una limitata attività esplorativa nei confronti del nuovo ambiente, riconducibile anche ad una maggiore permanenza degli animali sul fondo della vasca (Barcellos *et al.*, 2007; Cachat *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2009; Levin *et al.*, 2007).

Quindi dai risultati di questo test sembrerebbe che i *Danio rerio* mantenuti a 18°C siano quelli che mostrano maggiori livelli di ansia, poiché trascorrono un lasso di tempo maggiore sul fondo della vasca e nell'attività del *freezing*, attività che diminuisce nel corso dei dieci minuti di osservazione comportamentale. Inoltre, i pesci zebra mantenuti alle due temperature maggiori sembrerebbero quelli con un profilo di ansia minore, poiché sono quelli che, come attività preponderante, hanno quella dello *swimming*. I pesci provenienti dalla vasca mantenuta alla temperatura di 34°C sono anche quelli che, rispetto ai *Danio rerio* acclimatati a 18°C, trascorrono un intervallo maggiore nella porzione alta della vasca, quindi sembrerebbero i pesci maggiormente interessati all'attività di esplorazione di un nuovo ambiente.

Nel test del *dark/light preference* si può osservare che i *Danio rerio* mantenuti per quattro giorni alle tre differenti temperature mostrano una distribuzione molto diversa nelle due porzioni bianca/nera della vasca sperimentale. In particolare i pesci acclimatati per quattro giorni alla temperatura più bassa trascorrono un tempo maggiore nella porzione nera della vasca rispetto ai pesci provenienti dagli altri due trattamenti termici, mentre gli animali mantenuti a 34°C trascorrono un lasso di tempo maggiore nella porzione bianca della vasca rispetto ai pesci acclimatati a 18 e a 26°C. Inoltre, esaminando la preferenza per una porzione o l'altra della vasca intra-temperatura, possiamo osservare come i pesci mantenuti a 18 e 34°C trascorrono la gran parte del tempo del test rispettivamente nella porzione nera e in quella bianca, quindi mostrano una chiara preferenza per l'una o l'altra parte di questa vasca, mentre i pesci provenienti dal trattamento termico intermedio non mostrano una così netta scelta per le due porzioni della vasca sperimentale. Anche in questo test, i *Danio rerio* mantenuti a 34°C trascorrono un lasso di tempo maggiore nell'attività dello *swimming* rispetto ai pesci zebra mantenuti a 26°C, gli unici con cui si è potuto confrontarli poiché trascorrevano un cospicuo lasso di tempo nella porzione visibile della vasca, quella bianca.

In letteratura questo particolare test comportamentale è molto discusso, poiché i risultati ottenuti da diversi gruppi scientifici sono effettivamente molto vari. In alcuni casi i pesci zebra sembrano preferire la porzione bianca della vasca (Champagne *et al.*, 2010; Gerlai *et al.*, 2000; Gerlai *et al.*,

2006), in altri quella nera (Maximino *et al.*, 2007; Maximino *et al.*, 2010b; Serra *et al.*, 1999). In uno studio condotto da Champagne e colleghi (2010) si può osservare che il danio zebrato mantenuto a livelli bassi di stress trascorre gran parte del test nella porzione bianca della vasca, mentre animali sottoposti a livelli acuti di stress aumentano la loro presenza nella porzione nera dell'acquario.

Probabilmente la varietà di risultati riscontrati in questo particolare test comportamentale è dovuta alla mancata standardizzazione dell'apparato sperimentale (in alcuni casi la forma della vasca è circolare, altre volte è rettangolare; Blaser *et al.*, 2010; Stephenson *et al.*, 2011) e dell'illuminazione dello stesso (alcune volte si utilizza la luce della stanza, altre volte c'è un'illuminazione specifica sopra o sotto la vasca sperimentale; Blaser e Peñalosa, 2011; Steenbergen *et al.*, 2011 Stephenson *et al.*, 2011). Infatti, è stato osservato che incrementando il livello di luce nella porzione bianca della vasca andava decrescendo il tempo trascorso dai pesci zebra in questa porzione (Stewart *et al.*, 2010).

Verosimilmente, essendo una specie di pesce diurno, il *Danio rerio* durante il giorno e in condizioni di non di pericolo può preferire ambienti luminosi piuttosto che quelli scuri, poichè in questi sono più alte le *chance* per trovare cibo e/o partner riproduttivi e per evitare eventuali predatori, anche se può nascondersi in aree scure in risposta a pericoli (Gerlai *et al.*, 2000).

L'impiego del test del *dark/light preference* nello studio di sostanze ansiogene, come la caffeina, ha mostrato un incremento significativo del tempo trascorso nella porzione nera della vasca (Maximino *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2010), mentre le sostanze ansiolitiche, come le benzodiazepine o l'alcool, inducono un aumento significativo del tempo trascorso nella porzione bianca della vasca (Maximino *et al.*, 2011; Sackerman *et al.*, 2010).

Alla luce di questo, sembrerebbe che anche la temperatura di acclimatazione di 18°C dopo quattro giorni di acclimatazione in questo studio abbia indotto un livello di malessere nel pesce zebra, paragonabile all'effetto delle sostanze ansiogene, poichè i pesci provenienti da questa condizione hanno trascorso la maggior parte del tempo del test nella porzione nera della vasca. Al contrario, gli effetti della temperatura più alta sembrerebbero essere paragonabili alle sostanze ansiolitiche, vista la quasi totale preferenza di questi animali per la porzione bianca della vasca sperimentale.

Alla luce anche della sua ecologia di pesce diurno, sembrerebbe che i pesci mantenuti a 34°C abbiano una maggior propensione all'esplorazione della vasca e questo risultato è in linea anche con il comportamento osservato nel test del *novel diving tank* in questo stesso studio.

Dalla letteratura emerge che in periodi di acclimatazione brevi (quali 10 minuti o un giorno) la temperatura influenza l'attività locomotoria e il tasso di foraggiamento dei pesci zebra; in particolare questi animali aumentano l'attività locomotoria all'aumentare della temperatura (Pritchard *et al.*, 2001) e diminuiscono il tasso di foraggiamento al diminuire della temperatura (Condon *et al.*, 2010).

Sulla base di questi risultati, si potrebbe ipotizzare che il profilo maggiormente esplorativo dei pesci mantenuti per quattro giorni a 34°C sia dovuto ad un aumento temperatura-dipendente sia della necessità di foraggiamento che dell'attività locomotoria.

Effettivamente, in letteratura è noto che il metabolismo basale di organismi acquatici, in particolare marini, cresce al crescere della temperatura, per cui cresce il fabbisogno di cibo. Questo non si traduce necessariamente con un aumento delle dimensioni corporee, poichè molto spesso a temperature maggiori c'è un'efficienza di crescita minore, poichè gran parte dell'energia viene assorbita dall'aumentato costo di mantenimento (per la produzione, per esempio di proteine specifiche capaci di far fronte alle alte temperature), riducendo quindi sia la crescita corporea che la riproduzione (Barnes e Clarke, 1995; Hoffmann e Parsons, 1991; Peck e Conway, 2000; Somero, 2000). C'è da dire, comunque, che una maggiore attività degli animali è possibile solo con un metabolismo basale maggiore, quindi c'è una chiara connessione tra maggiore attività degli animali e maggior metabolismo negli organismi acquatici che vivono in acque più calde (Clarke and Johnston, 1999; Gillooly *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 1991; Zimmerman e Hubold, 1998).

Alla base di questo si può facilmente supporre che il pesce zebra mantenuto per quattro giorni ad una temperatura ipertermica di 34°C aumenta la sua attività esplorativa in risposta ad una maggior esigenza di cibo dovuta ad un aumento del metabolismo temperatura-dipendente. Sulla stessa base si può spiegare il comportamento poco esplorativo del *Danio rerio* mantenuto per quattro giorni alla temperatura ipotermica di 18°C, il quale sembra effettivamente meno propenso all'esplorazione dell'ambiente, forse perché il suo fabbisogno di cibo è calato in funzione dell'abbassamento della temperatura. Quindi lo stare nella porzione nera della vasca nel *dark/light preference test* o sul fondo in un'attività di *freezing* abbastanza accentuata nel test del *novel diving tank* potrebbero esser spiegati come un comportamento di protezione (per esempio, da un eventuale predatore) che ha avuto il sopravvento in un ambiente completamente nuovo. In questo contesto, i pesci mantenuti alla temperatura intermedia di 26°C sembrano avere un profilo a metà nei due test finora considerati, poichè tendono a visitare entrambi i comparti bianco/nero nel test del *dark/light preference* e tendono ad avere una spiccata attività di nuoto nel test del *novel diving tank*. In

quest'ultimo test tendono però ad esplorare meno la parte alta della vasca rispetto ai pesci mantenuti a 34°C, confermando quindi un'attività esploratoria che si va a posizionare a metà tra l'accentuata attività esploratoria dei pesci zebra mantenuti a 34°C e quella ridotta degli animali mantenuti a 18°C.

Il terzo test comportamentale che è stato proposto ai pesci zebra acclimatati per quattro giorni alle tre temperature, il *group preference*, serve ad analizzare un eventuale effetto del trattamento termico sul comportamento sociale/affiliativo di questi pesci. In questo particolare test i pesci mantenuti per quattro giorni a 18°C mostrano nuovamente un profilo molto differente dai pesci mantenuti alle altre due temperature, poichè trascorrono meno tempo nella metà superiore della vasca, soprattutto nei primi minuti di osservazione. Inoltre, rispetto alla temperatura intermedia trascorrono anche meno tempo vicino allo stimolo sociale e un maggior tempo nel comportamento dell'*erratic movements*.

Dalla letteratura sappiamo che l'*erratic movements* nel pesce zebra è un comportamento associato con alti livelli di ansia evocato da stress acuti (esposizione ad un predatore o il rilascio in acqua di un odore legato alla predazione, un cambio improvviso nell'intensità della luce nelle forme larvali) o che riflette uno stato generale di ansia e/o paura (Ahmad *et al.*, 2012; Cachat *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2009; Kalueff *et al.*, 2013).

Ancora in questo test i pesci zebra mantenuti a 18°C sembrerebbero essere quelli con un maggior livello di malessere, poichè manifestano questo comportamento per un tempo più lungo rispetto agli animali acclimatati alle altre due temperature sperimentali.

In alcuni lavori condotti su differenti specie di pesci un'elevata attività nella fase iniziale di un test comportamentale condotto su animali isolati è stata motivata come un modo di esplorare un nuovo ambiente velocemente e/o una ricerca di conspecifici (Gómez-Laplaza e Morgan, 1991). In questo contesto l'*erratic movements* degli animali mantenuti a 18°C potrebbe essere un modo per esplorare velocemente la vasca al fine di trovare un accesso al gruppo sociale, oppure potrebbe rappresentare la somma delle due spiegazioni, ossia essere un indice di malessere dei pesci mantenuti a 18°C che modificano il loro comportamento rispetto ad un test di esplorazione (il *novel diving tank test*), passando da una spiccata attività di *freezing* ad un aumento dell'attività dell'*erratic movements* nel tentativo di entrare in contatto velocemente con il gruppo di conspecifici. C'è, comunque, da aggiungere che nelle analisi intra-temperatura, tutti i trattamenti termici mostrano di trascorrere più tempo nelle attività di *swimming* e *thrashing*, quindi l'*erratic movements* dei pesci zebra acclimatati per quattro giorni a 18°C è maggiore rispetto a quello compiuto dagli animali acclimatati alle altre

temperature, ma non è l'attività comportamentale maggiormente espressa da questi soggetti sperimentali. Invece i pesci provenienti dai trattamenti termici più elevati ancora una volta mostrano un profilo simile, tendente ad una permanenza maggiore nella porzione di vasca adiacente lo stimolo sociale.

Al momento dei test comportamentali i pesci provenienti dai tre trattamenti termici avevano un peso differente, poichè risultano più pesanti i *Danio rerio* provenienti dalle vasche mantenute a 18 e 26°C. Questa differenza di peso fa supporre che la maggiore attività esplorativa dei pesci mantenuti a 34°C sia principalmente dovuta alla temperatura e non alle dimensioni corporee. Infatti sappiamo che in alcune specie di pesci un comportamento maggiormente audace e non timoroso è spesso associato ad una maggiore dimensione corporea (Brown *et al.*, 2007; Dowling e Godin, 2002; Ward *et al.*, 2004). Quindi dai risultati di questo studio sembrerebbe che per il *Danio rerio* le dimensioni non sono necessariamente un indice di audacia/timorosità, mentre sembrerebbe che un trattamento ipertermico di quattro giorni possa influire positivamente sull'attività esplorativa di questi animali.

I risultati ottenuti con questo trattamento condotto su pesci zebra *wild-type* linea commerciale suggeriscono che la temperatura dell'acqua esercita un'influenza sul loro comportamento. In questo lavoro gli animali sono stati esposti alle tre differenti condizioni termiche per quattro giorni, quindi una acclimatazione che dovrebbe esser considerata non acuta, ma di breve periodo. Dato che il pesce zebra rappresenta una specie che sempre più spesso viene impiegata come modello per le malattie umane, verificare se la temperatura può rappresentare uno stimolo stressante per questa specie può favorire l'impiego di un simile fattore, facilmente riproducibile nei laboratori, negli studi su farmaci o patologie legate all'ansia e allo stress. Inoltre, scegliendo i paradigmi comportamentali maggiormente utilizzati ad oggi con il *Danio rerio* (Cachat *et al.*, 2010; Champagne *et al.*, 2010; Gerlai *et al.*, 2000; Gerlai *et al.*, 2006; Maximino *et al.*, 2007; Maximino *et al.*, 2010b; Serra *et al.*, 1999), come il *novel diving tank test* o il *dark/light preference test*, si è cercato di verificare quali di questi test possono esser funzionali allo studio di una reazione da trattamento termico inappropriato. Ciò che è stato osservato in questo studio porta a supporre che le variazioni di temperatura influiscono sul comportamento del pesce zebra, già dopo soli quattro giorni di trattamento termico. Sembrerebbe inoltre che in un trattamento di breve durata sia la temperatura ipotermica quella che elicit maggiormente comportamenti poco esplorativi e affini ad uno stato di ansia nel *Danio rerio*.

4.2.2 Trattamento termico di lungo periodo dei *wild-type* linea commerciale

Dai risultati ottenuti in questo studio è emerso che dopo 21 giorni di trattamento termico c'è un'influenza della temperatura sia sulla distribuzione spaziale degli animali sia nei comportamenti esibiti nei diversi test comportamentali qui condotti.

Nel test del *novel diving tank* risulta che i pesce acclimatati per 21 giorni alla temperatura intermedia trascorrono un periodo maggiore di tempo nella parte bassa della vasca rispetto ai pesci acclimatati alle altre due temperature. Inoltre, questi soggetti sperimentali trascorrono nella parte alta della vasca un minor periodo di tempo rispetto ai pesci acclimatati a 18 e 34°C. Nei comportamenti possiamo osservare che i *Danio rerio* acclimatati alla temperatura intermedia effettuano per un periodo maggiore i comportamenti del *freezing* e dell'*erratic movements*, il primo rispetto ai pesci provenienti dalla vasca ipertermica, il secondo rispetto ai pesci provenienti dalla vasca ipotermica. Invece, i pesci mantenuti a 18°C mostrano di trascorrere più tempo nell'attività dello *swimming* rispetto ai pesci acclimatati a 26°C, mentre i *Danio rerio* provenienti dal trattamento ipertermico una maggiore attività di *thrashing* rispetto agli altri animali. Dopo 21 giorni di trattamento termico, a quanto sembra, sono gli animali mantenuti alla temperatura intermedia quelli che mostrano un profilo poco esplorativo e affine ad uno stato di malessere, poiché trascorrono un maggior tempo sul fondo e in due attività comportamentali fortemente legate a stati di ansia. Mentre i pesci mantenuti ai due regimi termici estremi mostrano delle attività maggiormente legate all'esplorazione, visitando la parte alta della vasca ed effettuando per un periodo di tempo maggiore le attività dello *swimming* e del *thrashing*. In questo caso il *thrashing* effettuato dagli animali mantenuti a 34°C non sembrerebbe avere nessuna implicazione con attività stereotipate, poiché questi pesci alternano frequentemente le due attività del *thrashing* e dello *swimming* e visitano molto spesso la parte alta della vasca.

Effettivamente, anche nel *dark/light preference test* i pesci acclimatati per 21 giorni alla temperatura intermedia mostrano un profilo meno incline all'esplorazione, poiché, insieme agli animali provenienti dal trattamento ipotermico, trascorrono un tempo maggiore nella porzione nera della vasca comportamentale. Solo i *Danio rerio* provenienti dalla vasca mantenuta a 34°C hanno trascorso un periodo di tempo maggiore nella porzione bianca, effettuando maggiormente le due attività dello *swimming* e del *thrashing*. Anche in questo caso il *thrashing* sembrerebbe essere associato ad una attività maggiormente esplorativa poiché nuovamente in associazione all'attività del nuoto.

In questo particolare test i pesci mantenuti al trattamento ipotermico mostrano un'espressione del comportamento del *freezing* maggiore rispetto ai pesci mantenuti a 34°C, soprattutto nei primi minuti del test, questo pur trascorrendo la gran parte del tempo sperimentale nella porzione nera della vasca.

In questo test, i pesci mantenuti a 18°C invertono il loro comportamento rispetto al test del *novel diving tank*, poiché se in uno trascorrono gran parte del tempo nella porzione alta e nell'attività dello *swimming*, nell'altro tendono invece a trascorrere molto tempo nella porzione nera e nell'attività del *freezing*. Quindi, mostrano un profilo comportamentale diverso a seconda del test, come se il test del *dark/light preference* fosse in qualche modo un test che inibisce l'attività esplorativa di questi animali rispetto al *novel diving tank test*. In alcuni lavori condotti sullo studio della tolleranza termica dei pesci in realtà è emerso che alcuni pesci tendono a tollerare temperature più elevate quando sono mantenuti con un fotoperiodo lungo, mentre fotoperiodi corti inducono gli animali ad essere maggiormente resistenti a temperature molto basse (Hoar e Robertson, 1959; Lutterschmidt e Hutchinson, 1997). Per cui, la preferenza dei pesci mantenuti a 18°C per 21 giorni per la zona nera della vasca potrebbe essere correlata non tanto ad una maggior cautela nell'esplorare l'ambiente sconosciuto, ma alla temperatura ipotermica che induce gli animali ad avere una preferenza per la parte scura della vasca (una preferenza per un ambiente che simuli un fotoperiodo corto) in aggiunta, anche, alla probabile diminuzione del loro metabolismo a causa del trattamento ipotermico.

Inoltre, nella letteratura dei roditori, è noto che, a seconda del trattamento o del genotipo degli animali osservati, capita spesso che ci siano conclusioni contraddittorie tra i risultati che emergono dai differenti test per la misura dei comportamenti legati all'ansia, come per esempio i test dell'*open field*, dell'*elevated plus maze* e del *dark/light preference* (Ramos *et al.*, 1997a,b; Ramos *et al.*, 2008; Trullas e Skolnick, 1993). Capita a volte che ciò che emerge in alcuni soggetti sperimentali con uno di questi test non è confermato con gli altri. E questo perché, nonostante la loro ampia diffusione, nessun test riesce a fornire una misura indiscutibile dello stato emozionale del soggetto sperimentale poiché ogni prova comportamentale valuta una frazione del profilo emozionale dell'animale (Blizard *et al.*, 2007; Cryan e Holmes, 2005; Ramos e Mormède, 1997a,b; Ramos *et al.*, 2008).

Invece i pesci mantenuti per 21 giorni a 34°C mostrano anche in questo test una maggiore attività esplorativa, trascorrendo molto tempo nella porzione bianca della vasca ed effettuando principalmente le due attività dello *swimming* e del *thrashing*.

Nel *group preference test* di nuovo i *Danio rerio* acclimatati al trattamento termico intermedio mostrano un profilo comportamentale apparentemente non esplorativo poiché sono i pesci che trascorrono un periodo di tempo maggiore nella parte bassa della vasca rispetto ai pesci mantenuti alle altre due temperature. Invece dopo 21 giorni di trattamento i pesci mantenuti a 18°C sono quelli che trascorrono più tempo nella metà vasca vicina lo stimolo sociale rispetto al trattamento termico intermedio. Anche se, andando ad analizzare il comportamento intra-temperatura, indipendentemente dal trattamento termico, tutti i pesci hanno mostrato di preferire la metà vasca con adiacente il gruppo sociale e le attività di *swimming* e *thrashing*, comportamenti in linea con questo tipo di test. Però mentre i pesci acclimatati a 18°C mostrano di esibire per un tempo maggiore il comportamento del *thrashing* rispetto ai pesci tenuti a 34°C, questi ultimi si dedicano maggiormente all'attività dello *swimming* rispetto ai primi. Ancora una volta sembra che il comportamento del *thrashing* sia effettuato da animali che mostrano un profilo non ansioso in questo particolare test, pur avendo manifestato un profilo maggiormente ansioso nel test del *dark/light preference*.

Come già si era potuto osservare nel trattamento termico di breve durata i pesci mantenuti a 34°C mostrano un'attività di *swimming* maggiore e questo può esser nuovamente spiegato dal fatto che questi animali aumentano la loro attività locomotoria all'aumentare della temperatura (Pritchard *et al.*, 2001). Inoltre, dalla letteratura si sa che in alcune specie di pesci (come le spigole) le alte temperature sono correlate ad un incremento della domanda di cibo (Claireaux e Lagardere, 1999; Peres e Oliva-Teles, 1999; Person-Le Ruyet *et al.*, 2004).

Dalla letteratura è noto che le prestazioni di nuoto di pesci zebra mantenuti per tre settimane a 18°C subiscono un significativo decremento nella velocità di nuoto (McClelland *et al.*, 2006), ma questo non è in linea con quanto osservato nel presente lavoro, poiché i pesci mantenuti a 18°C nel *novel diving tank test* mostrano una spiccata attività di nuoto. Questo potrebbe esser spiegato con la possibile capacità di questi animali di adattarsi a una temperatura non idonea per la loro sopravvivenza ottimale, capacità che ha impiegato diversi giorni per essere attuata. Infatti sappiamo che i pesci sono in grado di reagire ad una moltitudine di condizioni stressanti, anche di lunga durata, mettendo in pratica una serie di risposte adattative capaci di far tornare l'organismo in una situazione di omeostasi (Schreck, 2000; Schreck, 2010).

Ai pesci acclimatati per 21 giorni alle tre differenti temperature è stato proposto anche il *mirror test*, per verificare se la temperatura può influire in questo paradigma comportamentale solitamente impiegato nel pesce zebra per studiare il comportamento agonistico.

Per questo test si è scelto di posizionare lo specchio come suggerito in alcuni lavori in letteratura, a 45° sulla parete posteriore della vasca rispetto alla telecamera, di modo da avere un riflesso molto vicino da un lato della vasca e un riflesso più lontano man mano che il pesce si spostava dal lato della vasca verso il centro (Blaser e Gerlai, 2006; Gerlai *et al.*, 2000). È stata però inserita una variante, quella di lasciare una metà vasca priva dello specchio, in modo da concedere agli animali la possibilità di scegliere se trovarsi nella parte di vasca dove era presente un'immagine riflessa o se trovarsi nella parte di vasca priva dello specchio. Da questo studio è emerso che i pesci mantenuti a 34°C per 21 giorni trascorrevano più tempo nella parte dello specchio dove l'immagine riflessa era più vicina rispetto agli animali mantenuti a 26°C (la zona definita *near mirror*). Un pesce zebra isolato che incontra un conspecifico spesso esibisce un comportamento agonistico (Blaser e Gerlai, 2006; Gerlai *et al.*, 2000); quindi il paradigma comportamentale dello specchio nel pesce zebra è utilizzato per studiare il comportamento agonistico. Poichè pesci solitari che incontrano un conspecifico dello stesso genere mostrano *display* aggressivi, negli studi che hanno impiegato questo paradigma comportamentale sono stati considerati attacco al conspecifico (il riflesso del pesce nello specchio) tutte quelle posture aggressive come l'erezione delle pinne, movimenti ondulatori del corpo o morsi rivolti verso lo specchio. In questo studio questo comportamento non è risultato influenzato dalla temperatura, semplicemente i pesci acclimatati a 34°C mostravano una maggior permanenza nella zona dove il riflesso era più vicino. Questo potrebbe essere non tanto un indice di un maggior comportamento agonistico, poichè non si osserva un aumento nell'espressione dei comportamenti aggressivi, ma semplicemente un indice di maggior interesse verso il conspecifico riflesso. E questo potrebbe significare che per i pesci mantenuti a 34°C lo specchio ha elicitato un interesse di tipo affiliativo e non aggressivo e questo potrebbe essere in linea con la maggior attività esplorativa degli animali mantenuti a 34°C. Poichè è ipotizzabile che animali che hanno maggior bisogno di esplorare, a causa di un innalzamento nel loro livello di metabolismo (Clarke e Johnston, 1999; Gillooly *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 1991; Zimmerman e Hubold, 1998), possono sentire maggiormente il bisogno di fare *shoaling* con un conspecifico, al fine di sentirsi maggiormente protetto da un eventuale predatore (Gerlai *et al.*, 2000). Anche se nel test del *group preference*, pur risultando dalle analisi intra-temperatura che tutti i trattamenti erano maggiormente propensi a stare nella metà vasca adiacente allo stimolo sociale, solo i pesci provenienti dal trattamento ipotermico hanno mostrato di preferire la vicinanza al gruppo rispetto agli animali mantenuti alla condizione intermedia.

Inoltre nel *mirror test* risulta che i pesci acclimatati per 21 giorni al trattamento ipotermico mostrano un'attività di *slow swimming* maggiore rispetto ai pesci acclimatati alle altre due temperature. In questo studio l'attività di *slow swimming* è sempre stata molto ridotta e appare strano che questo paradigma comportamentale possa averlo elicitato. Potrebbe esser spiegato come l'esplicazione di un comportamento cauto, in qualche modo anche questi animali reagiscono al riflesso dello specchio, non con un comportamento aggressivo, ma con un nuoto cauto e lento che potrebbe permettere agli animali di valutare meglio il comportamento del presunto conspecifico.

Dopo 21 giorni di trattamento termico, il peso degli animali è risultato differente, in particolare i pesci mantenuti a 18°C sono più pesanti dei pesci acclimatati a 26°C.

Importante notare la differenza di comportamento dei pesci mantenuti a 26°C per quattro e 21 giorni di acclimatazione termica, poiché questa temperatura rappresenta la condizione termica molto diffusa sia in natura che nei laboratori di ricerca (Lawrence, 2007; Matthews *et al.*, 2002; Schaefer e Ryan, 2006; Spence *et al.*, 2008).

Andando a confrontare il peso degli animali acclimatati a 26°C per quattro e 21 giorni risulta che i pesci mantenuti per un tempo più lungo a questa temperatura sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli acclimatati per un periodo più breve (dati non mostrati); quindi dai dati qui riportati sembrerebbe nuovamente che il *Danio rerio* non è un pesce in cui l'audacia del comportamento sia dimensione-dipendente. Dalla letteratura sappiamo che nelle situazioni di rischio, come l'attacco di un predatore, l'abbandono dei rifugi in molti pesci è dimensione-dipendente, con animali più grandi che impiegano più tempo ad uscire da un rifugio rispetto a quelli più piccoli. Questo perché un animale più grande nelle dimensioni può stare un periodo maggiore senza doversi occupare della ricerca del cibo (Fuiman e Magurran, 1994; Krause *et al.*, 1998; Sogard, 1997). Poiché la cattura dei pesci (e in generale degli animali da laboratorio) per esser posti negli apparati sperimentali può esser piuttosto stressante (Stewart *et al.*, 2011), c'è da aspettarsi un'iniziale risposta di ansia da parte di tutti gli animali. E in quest'ottica la differenza del comportamento dei pesci mantenuti a 26°C troverebbe una possibile spiegazione, poiché gli animali mantenuti per 21 giorni hanno delle dimensioni di molto superiori rispetto a quelli provenienti dal trattamento termico intermedio di breve periodo. Quindi la loro poca attività potrebbe esser spiegata come una reazione alla cattura per esser messi nelle vasche sperimentali in un contesto di scarsa necessità di nutrimento, essendo stati sottoposti per più di un mese ad un regime alimentare consistente.

Invece, l'elevata attività degli animali mantenuti alle due temperature estreme (18 e 34°C) potrebbero trovare una spiegazione nell'inizio di un malessere temperatura-dipendente. Infatti dalla

letteratura sappiamo che pesci zebra acclimatati per un mese alle temperature di 18 e 34°C mostrano un declino delle caratteristiche funzionali (Vergauwen *et al.*, 2010), ma l'acclimatazione al trattamento termico di 34°C è stata considerata maggiormente stressante rispetto ad una acclimatazione a 18°C, poiché è una temperatura più vicina alla soglia di tolleranza del *Danio rerio* (Cortemeglia e Beitinger, 2005; Schaefer e Ryan, 2006). In realtà, diversi studi dimostrano che i pesci, soprattutto quelli marini, sono meglio adattati a resistere ad improvvise esposizioni a temperature vicine al limite letale superiore rispetto a quello inferiore (Beitinger *et al.*, 2000; Bennett e Judd, 1992; Mundahl, 1990).

Quanto rilevato a livello di crescita corporea nel presente progetto di dottorato è effettivamente poco in linea con quanto osservato da Vergauwen e colleghi (2010) poiché il peso degli animali mantenuti ai due trattamenti termici di 18 e 34°C non ci fa supporre che queste due temperature hanno rappresentato uno stress per la crescita degli animali. Questo però potrebbe esser spiegato dal differente regime alimentare adottato in questo studio, poiché nel lavoro di Vergauwen e colleghi (2010) gli animali venivano nutriti con una quantità di cibo pari all'1% del loro peso medio, mentre nel presente lavoro gli animali sono stati nutriti presumibilmente con quantità maggiori, poiché venivano alimentati tre volte al giorno fin quando non restava del cibo in avanzo sul fondo della vasca. La scelta di un differente regime alimentare è stata dettata proprio dall'osservazione in una fase pilota, che i *Danio rerio* mantenuti per più giorni alla temperatura di 34°C con un regime alimentare basato sugli standard dei laboratori di ricerca (dove la temperatura dell'acqua è mantenuta solitamente a 28-28,5°C) portava gli animali ad un veloce deperimento fisico. Quindi, pur non essendoci stato un declino nel loro peso, l'esser stati mantenuti per 21 giorni a due temperature non conformi alle loro esigenze può aver comunque indotto uno stato di disagio negli animali. Infatti sappiamo che animali stressati dal punto di vista energetico ripristinano le attività più velocemente di quelli che non lo sono (Lima, 1998). Per cui gli i *Danio rerio* mantenuti a 26°C per 21 giorni potrebbero aver avuto una reazione maggiore alla cattura per esser posti nelle vasche sperimentali, poiché mantenuti in un regime termico che probabilmente non produceva in loro nessun tipo di disagio fisico e ad un regime alimentare abbastanza cospicuo da indurli ad esser poco esplorativi nei dieci minuti di test comportamentale.

Inoltre, dalla letteratura sappiamo che normalmente, quando sono in natura, i pesci migrano verso zone con temperature più idonee alle loro necessità (Martins *et al.*, 2011; Ottersen *et al.*, 2004), quindi l'elevata attività dei pesci acclimatati alle due temprature di 18 e 34°C potrebbe esser anche un modo per cercare un habitat più conforme alle loro esigenze.

I risultati ottenuti con questo trattamento nei pesci zebra *wild-type* linea commerciale suggeriscono che la temperatura dell'acqua esercita un'influenza sul loro comportamento. In questo lavoro gli animali sono stati esposti alle tre differenti condizioni termiche per 21 giorni, quindi un'acclimatazione che dovrebbe esser considerata come di lungo periodo. Come già sottolineato precedentemente, l'importanza del pesce zebra come animale modello in patologie umane spesso legate allo stress aumenta costantemente, quindi verificare se la temperatura può rappresentare uno stimolo stressante per questa specie può dare indicazioni per studi di questo tipo. Inoltre, utilizzando i paradigmi comportamentali maggiormente frequenti nella letteratura di questa specie, si è voluto esaminare quali di questi test possono esser funzionali allo studio di una reazione da trattamento termico inappropriato. Ciò che è stato osservato in questo studio porta a supporre che le variazioni di temperatura influiscono in modo differente sul comportamento del pesce zebra, a seconda di quanto dura il trattamento termico. Sembrerebbe infatti che in un trattamento di lungo termine il trattamento ipotermico vada ad elicitare risposte presumibilmente legate a stati di ansia (tipo il *freezing*) solo in alcuni paradigmi comportamentali, mentre il trattamento ipertermico sia quello a cui gli animali reagiscono con una maggiore risposta di esplorazione e attività. Resta da verificare, attraverso un possibile prolungamento del trattamento termico, se l'attività esplorativa dei pesci mantenuti a 34°C possa esser un indice di benessere degli animali o se sia riconducibile ad uno stato di disagio, che si traduce nel tentativo di ricerca di vie di fuga per cercare un habitat maggiormente idoneo alle esigenze di questa specie. Forse i risultati di natura neurochimica che saranno presentati dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" dell'Università Sapienza di Roma che ha collaborato nel presente progetto, potranno dare delle indicazioni maggiori su come interpretare questo comportamento.

4.2.3 Trattamento termico di lungo periodo dei *wild-type* linea AB

Dai risultati ottenuti in questo studio è emerso che dopo 21 giorni di trattamento termico in questa linea *wild-type* si può osservare un'influenza della temperatura solo in alcuni test comportamentali: il *novel diving tank test* e il *mirror test*.

Nel test del *novel diving tank* risulta che i pesci acclimatati per 21 giorni alla temperatura ipertermica trascorrono un periodo maggiore di tempo nella parte alta della vasca rispetto ai pesci acclimatati al trattamento ipotermico, soprattutto negli ultimi minuti del test comportamentale. Invece, i danio zebrati mantenuti a 18°C trascorrono un periodo di tempo maggiore nella parte intermedia della vasca.

Anche in questa linea sembra che gli animali acclimatati alla temperatura maggiore abbiano una maggiore attività esplorativa nei confronti della parte alta della vasca rispetto agli animali provenienti dagli altri trattamenti.

L'attività dello *swimming* è maggiore nei *Danio rerio* acclimatati a 18°C rispetto agli animali mantenuti al trattamento ipertermico. Questo comportamento non è in linea con quanto trovato in altri studi (Pritchard *et al.*, 2001) e anche in questo stesso studio con gli altri pesci zebra *wild-type* linea commerciale, poichè solitamente negli organismi ectotermici sono le alte temperature che aumentano le attività di nuoto (Clarke e Jhonson, 1999; Gillooly *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 1991; Zimmerman e Hubold, 1998). Si può osservare che i pesci di questa linea mantenuti a 34°C hanno effettuato una grande attività di *thrashing* che, associato alle loro escursioni nella parte alta della vasca per periodi più lunghi, potrebbe esser interpretato, comunque, come un comportamento esploratorio.

Per quanto riguarda il *mirror test* l'unica differenza si rileva a carico del comportamento dell'*erratic movements*, poichè è maggiore nei pesci acclimatati a 34°C, i quali lo compiono nell'arco dei primi due minuti di test. Poichè dalla letteratura sappiamo che questa attività frenetica è principalmente legata a stati di ansia nel pesce zebra (Kalueff *et al.*, 2013; Maximino *et al.*, 2010a,b; Stewart *et al.*, 2012), sembra che la principale influenza dell'alta temperatura in questa particolare linea si rifletta su un iniziale stato di malessere. Questo comportamento si osserva, però, solo nel *mirror test*, il quale è considerato in letteratura un paradigma comportamentale per studiare il comportamento agonistico del danio zebrato. Infatti è noto che un pesce zebra che incontra un altro individuo solitario dello stesso sesso solitamente esibisce un comportamento aggressivo, attraverso tutta una serie di *display* fisici (Blaser e Gerlai, 2006; Desjardins e Fernald, 2010; Elwood *et al.*, 2014; Gerlai *et al.*, 2000). Per cui, una maggiore attività dell'*erratic movements* da parte dei pesci zebra della linea AB mantenuti a 34°C potrebbe indicare una maggiore reazione al riflesso dello specchio. Sappiamo infatti che a seconda della linea di *Danio rerio* impiegata gli animali possono risultare più o meno audaci, aggressivi o ansiosi (Barba-Escobedo e Gould, 2012; Cachat *et al.*, 2010; Moretz *et al.*, 2007; Robison e Rowland, 2005; Wringht *et al.*, 2003). Poco sappiamo del comportamento della linea AB, l'unico lavoro fatto confrontando questa linea con altre, ci dice che questi animali hanno un profilo maggiormente ansioso dei pesci zebra *wild-type* linea WIK (Sackerman *et al.*, 2010). Quindi possiamo supporre che in questo ceppo particolare il trattamento termico di 34°C abbia indotto un maggior malessere in un contesto agonistico, visto anche che la letteratura ci indica un maggior costo energetico per gli animali mantenuti a questa

temperatura (Vergauwen *et al.*, 2010). Possiamo ipotizzare che, in una situazione di inizio di malessere fisico dovuto all'acclimatazione ad una temperatura poco idonea, i pesci abbiano reagito in un primo momento con un'attività legata all'ansia piuttosto che con un comportamento aggressivo.

Un'ulteriore differenza la notiamo anche a carico del peso, poichè i *Danio rerio* acclimatati a 18°C risultano esser più pesanti di quelli mantenuti alla temperatura più alta. Presumibilmente, le maggiori dimensioni dei pesci mantenuti a 18°C non sembrerebbero legate alla propensione di questi animali di esplorare la parte alta della vasca nel *novel diving tank test*. Infatti sono proprio i pesci acclimatati a 34°C, i più piccoli, ad attuare la maggiore attività esplorativa nella porzione alta di questo acquario.

Essendo questa linea selezionata in laboratorio (ZFIN lab, University of Oregon), una sua probabile caratteristica potrebbe essere quella di avere un tasso di eterozigosi minore rispetto alle linee acquistabili nei negozi, quindi con una potenziale variabilità fisiologica ridotta. Anche in questo contesto non possiamo escludere che il comportamento dei pesci mantenuti a 34°C possa indicare un inizio di uno stato di malessere legato al trattamento ipertermico, visto l'elevata attività dell'*erratic movements* rilevabile nel *mirror test* e la scarsa propensione all'attività dello *swimming* nel *novel diving tank test*. Come già detto, i pesci zebra possono vivere per lunghi periodi (circa un anno) a temperature di 18°C (Cortemeglia e Beitinger, 2005; Matthews *et al.*, 2002; Vergauwen *et al.*, 2010), mentre acclimatazioni a temperature maggiori (prossime alla soglia di sopravvivenza di questi animali) sono energeticamente più costose per questi pesci.

In questa particolare linea di pesci zebra è possibile che, a causa di un tasso di eterozigosi minore, l'alta temperatura abbia rappresentato uno stress già in tre settimane di acclimatazione, inducendo quindi un inizio di malessere nei pesci acclimatati a 34°C. Quindi non possiamo escludere che l'elevata attività esplorativa osservabile nel *novel diving tank test* (ipotizzabile dagli spostamenti verso l'alto e anche dal *thrashing*) stia ad indicare, piuttosto che una maggiore audacia, un'esigenza dei pesci di cercare un possibile passaggio verso situazioni ambientali più consone ai loro bisogni.

I risultati ottenuti con questo trattamento suggeriscono che la temperatura dell'acqua esercita un'influenza sul comportamento degli adulti di pesce zebra di una linea geneticamente selezionata in laboratorio. In questo lavoro gli animali sono stati esposti alle tre differenti condizioni termiche per 21 giorni, quindi una acclimatazione che dovrebbe esser considerata come di lungo periodo. Dato che il pesce zebra rappresenta una specie che sempre più spesso viene impiegata come modello per le malattie umane, verificare se, a seconda del ceppo che si impiega nella ricerca, c'è

una differenza di reazione alla temperatura può rappresentare uno stimolo ad un maggior cautela nell'uso di pesci acquistati nei negozi come animali di controllo. Ciò che è stato osservato in questo studio porta a supporre che le variazioni di temperatura influiscono in modo differente sul comportamento del pesce zebra. Sembrerebbe infatti che in un trattamento termico di lungo periodo in pesci zebra *wild-type* linea AB, sia la temperatura maggiore ad indurre un comportamento legato all'ansia in un test sociale (*mirror test*). Sicuramente, va indagata maggiormente l'attività esplorativa dei pesci della linea AB, poiché non possiamo ancora affermare se sia legata ad un aumento del tasso metabolico degli animali o se sia legata ad una ricerca di un habitat più idoneo. Probabilmente già con i dati di natura neurochimica che saranno presentati dal gruppo dell'Università di Copenhagen, *Department of Veterinary Disease Biology, Laboratory of Aquatic Pathobiology* che ha collaborato nel presente progetto, si potranno dare delle indicazioni maggiori su come interpretare questo particolare comportamento.

5 CONCLUSIONI

Lo scopo del presente studio era verificare se il comportamento di due specie diverse di pesci potesse subire delle modificazioni a seconda della temperatura di allevamento.

In tutti gli esperimenti qui condotti si è potuta osservare un'influenza del trattamento termico sul comportamento dei pesci utilizzati. Tuttavia, le risposte osservate non sono univoche e tendono ad esser specifiche a seconda della specie o della linea di animale impiegata, nonché del tipo di trattamento termico imposto agli animali.

Nei test effettuati con le spigole, acclimatate per 21 giorni alle tre temperature sperimentali, possiamo osservare che:

- 1) La temperatura di acclimatazione ha un'influenza sul comportamento di questi animali
- 2) Gli animali mantenuti alla temperatura maggiore hanno mostrato un'eccitazione maggiore in presenza di una preda, senza però aumentare il consumo di questa
- 3) Tutti gli animali provenienti dai tre diversi trattamenti termici hanno risposto con la fuga al test avversivo
- 4) I pesci mantenuti alla temperatura intermedia hanno mostrato un maggiore interesse al proprio riflesso nello specchio

Nei test effettuati con i *Danio rerio wild-type* linea commerciale acclimatati per quattro giorni alle tre temperature sperimentali, emerge che:

- 1) La temperatura di acclimatazione ha un'influenza sul comportamento di questi animali
- 2) I pesci acclimatati alla temperatura più bassa mostrano un profilo comportamentale meno esplorativo
- 3) I pesci mantenuti alla temperatura più alta mostrano un profilo comportamentale più esplorativo
- 4) I pesci mantenuti alla temperatura intermedia mostrano un profilo comportamentale che sembra essere a metà tra l'accentuata esplorazione dei pesci provenienti dal trattamento ipertermico e la ridotta esplorazione dei danio zebrati provenienti dal trattamento ipotermico

Nei test effettuati con i *Danio rerio wild-type* linea commerciale acclimatati per 21 giorni alle tre temperature sperimentali, emerge che:

- 1) La temperatura di acclimatazione ha un'influenza sul comportamento di questi animali

- 2) I pesci mantenuti alla temperatura intermedia mostrano un profilo comportamentale poco esplorativo
- 3) I pesci mantenuti alla temperatura più alta mostrano un profilo comportamentale esplorativo ed hanno un'attività di nuoto accentuata
- 4) I pesci mantenuti alla temperatura più bassa sembrano essere esplorativi solo in un test comportamentale (il *novel diving tank*), attuando in questo una notevole attività di nuoto

Nei test effettuati con i *Danio rerio wild-type* linea AB acclimatati per 21 giorni alle tre temperature sperimentali, emerge che:

- 1) La temperatura di acclimatazione ha un'influenza sul comportamento di questi animali solo in alcuni test
- 2) I pesci mantenuti alla temperatura maggiore hanno alcuni tratti comportamentali riconducibili ad un'attività esplorativa
- 3) I pesci mantenuti alla temperatura più bassa hanno una maggiore attività di nuoto

Quindi, le risposte e gli adattamenti di questi pesci sembrano esser differenti, a seconda sia dalla durata del trattamento termico, sia dalla linea genetica impiegata.

A causa delle risposte comportamentali così varie ottenute nel presente lavoro, saranno necessari ulteriori studi per poter affermare che le temperature qui impiegate possano avere un effetto stressante su queste specie di pesci.

Bibliografia

- Abrahams M, Colgan P. Risk of predation, hydrodynamics efficiency and their influence on school structure. *Environmental Biology of Fishes*, 1985; 13: 195-202.
- Agersborg HPK. The influence of temperature on fish. *Ecology*, 1930; 11: 136-144.
- Ahmad F, Noldus LPJJ, Tegelenbosch R, Richardson M. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*, 2012; 149: 1241-1281.
- Ardizzone GD, Cataudella S, Rossi R. Management of coastal lagoon fisheries and aquaculture in Italy. *FAO Fisheries Technical Paper*, 1988; 293: 103. Roma.
- Armstrong PR. Directed motion in the sea: efficient swimming by reef fish larvae. *Journal of Theoretical Biology*, 2001; 201: 81-91.
- Ashley PJ. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 2007; 104: 199-235.
- Associazione piscicoltori italiani (API) e Istituto centrale per la ricerca scientifica e tecnologica applicata al mare (ICRAM). *Quadro Generale dell'Acquacoltura Italiana*, 2007.
- Atema, J. Chemical sense, chemical signals, and feeding behavior in fishes. In: *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes* (Bardach, JE, Magnuson JJ, May RC, Reinhart JM, eds). International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, 1980: 57-101.
- Atkinson D. Ectotherm life-history responses to developmental temperature. In: *Animals and temperature* (Johnston IA, Bennett AF, eds), Cambridge University Press, 1996: 183-204.
- Barba-Escobedo PA, Gould GG. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, Brain and Behavior*, 2012; 11: 366-373.
- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, de Souza SMG, Lulhier F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L) fingerlings. *Aquaculture Research*, 1999; 30: 887-892.
- Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, da Silva LB, Bedin AC, Finco J, Cericato L. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture*, 2007; 272: 774-778.
- Barnabé G, 1991. Grossissement des poissons en élevage intensif. In: *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture* (Barnabé G, ed), Lavoisier-Tec & Doc, Paris, 1991: 422-451.
- Barnes DKA, Clarke A. Seasonality of feeding in Antarctic suspension feeders. *Polar Biology*, 1995; 15, 335-340.
- Barreto RE, Volpato GL. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*, 2004; 66: 43-51.
- Barton BA, Schreck CB. Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Transaction of the American Fisheries Society*, 1987; 116: 257-263.

- Barton BA. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 2002; 42: 517-525.
- Bass SLS, Gerlai R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effect of sympatric and allopatric predators and harmless fish. *Behavioural Brain Research*, 2008; 186: 107-117.
- Bassett DI, Currie PD. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Human Molecular Genetics*, 2003; 12: 265-270.
- Beamish FWH. Swimming capacity. In: *Fish physiology* (Hoar WS, Randall DJ, eds), vol 7. Academic, New York, 1978: 101-118.
- Beitinger TL, Bennett WA, McCauley RW. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 2000; 58: 237-275.
- Belanger SE, Cherry DS, Cairns JJ. Seasonal, behavioral and growth changes of juvenile *Corbicula fluminea* exposed to chrysotile asbestos. *Water Research*, 1986; 20: 1243-1250.
- Bennett WA, Judd FW. Comparison of methods for determining low temperature tolerance: experiments with pinfish, *Lagodon rhomboides*. *Copeia*, 1992; 4: 1059-1065.
- Bickler PE, Buck LT. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, 2007; 69: 145-170.
- Bilotta J, Saszik S, Delorenzo AS, Hardesty HR. Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioral research facility. *Behavior Research Methods, Instruments and Computers*, 1999; 31:178-184.
- Bisazza A, De Santi A, Vallortigara G. Laterality and cooperation: mosquitofish move closer to a predator when the companion is on their left side. *Animal Behaviour*, 1999; 57: 1145-1149.
- Blaser R, Gerlai R. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Methods*, 2006; 38: 456-469.
- Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 2010; 208: 56-62.
- Blaser RE, Peñalosa YM. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiology and Behavior*, 2011; 104: 831-837.
- Blaxter JHS, Ten Hallers-Tjabbes CC. The effects of pollutants on sensory systems and behaviour of aquatic animals. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 1992; 26: 43-58.
- Blecha F, Pollman DS, Nichols DA. Weaning Pigs at an Early Age Decreases Cellular Immunity. *American Society of Agronomy*, 1983; 56: 396-400.
- Blizard DA, Takahashi A, Galsworthy MI, Martin B, Koide T. Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *Journal of Psychopharmacology*, 2007; 21:136-139.
- Bolis CL, Piccolella M, Dalla Valle AZ, Rankin JC. Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacological Research*, 2001; 44: 265-280.

- Braida D, Limonta V, Pegorini S, Zani A, Guerrini-Rocco C, Gori E, Sala M. Hallucinatory and rewarding effect of salvinorin A in zebrafish: κ -opioid and CB₁-cannabinoid receptor involvement. *Psychopharmacology*, 2007; 190: 441-448.
- Brännäs E, Johnsson JI. Behaviour and welfare in farmed fish. In: *Fish behaviour* (Magnhagen C, Braithwaite VA, Forsgren E, Kapoor BG, eds), CRC Press, 2008: 593-627.
- Brett J. Environmental factors affecting growth. In: *Fish Physiology* (Hoare WH, Randall DJ, Brett SR, eds), vol 8, Academic Press, 1987: 252-259.
- Bronstein PM. Predictors of dominance in male *Betta splendens*. *Journal of Comparative Psychology*, 1985a; 99: 47-55.
- Bronstein PM. Prior-residence effect in *Betta splendens*. *Journal of Comparative Psychology*, 1985b; 99: 56-59.
- Brown C, Davidson T, Laland K. Environmental enrichment and prior experience of live prey improve foraging behavior in hatchery-reared Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 2003; 63: 187-196.
- Brown C, Jones F, Braithwaite VA. Correlation between boldness and body mass in natural populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi*. *Journal of Fish Biology*, 2007; 71: 1590-1601.
- Brownlie A, Donovan A, Pratt SJ, Paw BH, Oates AC, Brugnara C, Witkowska HE, Sassa S, Zon LI. Positional cloning of the zebrafish sauternes gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature Genetics*, 1998; 20: 244-250.
- Brunelli G. La coltivazione degli stagni salsi e la vallicoltura. *Bollettino di pesca, piscicoltura ed idrobiologia. Pesca*, 1933; IX: 791-798.
- Bucke D. Aquatic pollution: effects on the health of fish and shellfish. *Parasitology*, 1993; 106: 25-37.
- Cachat J, Canavello P, Elegante M, Bartels B, Hart P, Bergner C, Egan R, Duncan A, Tien D, Chung A, Wong K, Goodspeed J, Tan J, Grimes G, Elkhayat S, Suci C, Rosenberg M, Chung KM, Kadri F, Roy S, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Mohnot S, Beeson E, Amri H, Zukowska Z, Soignier RD, Kalueff AV. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 2010; 208: 371-376.
- Cachat J, Stewart A, Utterback E, Hart P, Gaikwad S, Wong K, Kyzar E, Wu N, Kalueff AV. Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. *Plos One*, 2011; 6: 1-14.
- Camargo JA, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 2006; 32: 831-849.
- Canfield JG, Rose GJ. Activation of Mauthner neurons during prey capture. *Journal of Comparative Physiology A*, 1993; 172: 611-618.
- Champagne DL, Hoefnagels CCM, de Kloet RE, Richardson MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, 2010; 214: 332-342.
- Chang PH, Plumb A. Effects of salinity on *Streptococcus* infection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 1996; 6: 39-45.

- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. The Journal of American Medical Association, 1992; 267: 1244-1252.
- Cioni C, Malavasi S, Manciocco A, Toni M, Crosetti D, Cipolatto G, Geogalas V, Tedesco A, Alleva E. Behavioural and physiological effects of temperature increase on European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Scientific Research and Safeguarding of Venice, vol 7, 2011: 257-270.
- Claireaux G, Lagardere JP. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. Journal of Sea Research, 1999; 42: 157-168.
- Claireaux G, Couturier C, Groison AL. Effect of temperature on maximum swimming speed and cost of transport in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Experimental Biology, 2006; 200: 3420-3428.
- Clarke A, Johnston NM. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. Journal of Animal Ecology, 1999; 68: 893-905.
- Clarke A. costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. Trends in Ecology and Evolution, 2003; 11: 573-581.
- Clarke A, Fraser KPP. Why does metabolism scale with temperature? Functional Ecology, 2004; 18: 243-251.
- Colborn DR, Thompson DL, Roth TLJ, Capehart JS, White KL. Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. Journal of Animal Science, 1991; 69:2556-2562.
- Colborn T, Vom Saal F, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental Health Perspectives, 1993; 101: 378-384.
- Colborn T, Short P, Gilbertson M. Health effects of contemporary-use pesticide: the wildlife/human connection. Toxicology and Industrial Health, 1998; 15: 1-2.
- Condon CH, Chenoweth SF, Wilson RS. Zebrafish take their cue from temperature but not photoperiod for the seasonal plasticity of thermal performance. The Journal of Experimental Biology, 2010; 213: 3705-3709.
- Cortemeglia C, Beitinger TL. Temperature tolerances of wildtype and red transgenic zebra danios. Transaction of the American Fisheries Society, 2005; 134: 1431-1437.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. Nature Review Drug Discovery, 2005; 4:775-790.
- DeKoven DL, Nunez JM, Lester SM, Conklin DE, Marty GD, Parker LM, Hinton DE. A purified diet foe medaka (*Oryzias latipes*): refining a fish model for toxicological research. Laboratory Animal Sciences, 1992; 2: 180-189.
- Desjardins JK, Fernald RD. What do fish make of mirror images? Biology Letters, 2010; 6: 744-747.
- Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000; 917: 876-893.
- Dias J, Gomes EF, Kaushik SJ. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European seabass fed plant-protein rich diets. Aquatic Living Resources, 1997; 10: 385-389.

- Dickson KA, Donley JM, Sepulveda C, Bhoopat L. Effects of temperature on sustained swimming performance and swimming kinematics of the chub mackerel *Scomber japonicus*. *Journal of Experimental Biology*, 2002; 205:969-980.
- Domenici P, Blake RW. The kinematics and performance of the escape response in the angelfish (*Pterophyllum eimekei*). *Journal of Experimental Biology*, 1991; 177: 253-272.
- Domenici P, Ferrari RS, Steffensen JF, Batty RS. The effects of progressive hypoxia on school structure and dynamics in Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 2002; 269: 2103-2111.
- Domenici P, Lefrancois C, Shingles A. Hypoxia and the antipredator behaviours of fishes. *Philosophical Transactions B*, 2007; 362: 2105-2121.
- Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2000; 10: 252-256.
- Dowling LM, Godin JGJ. Refuge use in a killifish: influence of body size and nutritional state. *Canadian Journal of Zoology*, 2002; 80: 782-788.
- Echevarria DJ, Hammack CM, Pratt DW, Hosemann JD. A novel behavioral test battery to assess global drug. *International Journal of Comparative Psychology*, 2008; 21: 19-34.
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV. Understanding behavioural and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 2009; 205: 38-44.
- Eisenreich SJ. Climate changes and the European water dimension. A report to the European Water Directors. European Commission, EUR 21553, Bruxelles, 2005.
- Elwood RW, Stoilova V, McDonnell A, Earley RL, Arnott G. Do mirrors reflect reality in agonistic encounters? A test of mutual cooperation in displays. *Animal Behaviour*, 2014; 97: 63-67.
- Engeszer RE, Ryan MJ, Parichy DM. Learned social preference in zebrafish. *Current Biology*, 2004; 14: 881-884.
- Evans DH. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 1987; 71: 47-58.
- European Commission (EC). Recommendation 2007/526/EC of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525) (Text with EEA relevance). *Official Journal of European Union* 30/7/2007. L197, 2007: 1-89.
- European Union (EU). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of European Union* 20/10/2010. L276, 2010: 33-79.
- Farrell AP, Sobin SS, Randall DJ, Crosby S. Intralamellar blood flow patterns in fish gills. *American Journal of Physiology*, 1980; 239: 428-436.

- Festa-Bianchet M, Apollonio M. General introduction. In: Animal behavior and wildlife conservation (Festa-Bianchet M and Apollonio M, eds). Island Press, 2003: 3-12.
- Fletcher TC. Dietary effects on stress and health. In: Fish Stress and Health in Aquaculture (Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB, eds). Society for experimental biology seminar series. Cambridge University Press, UK, 1997: 223-246.
- Fuiman L, Magurran AE. Development of predator defenses in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1994; 4: 145-183.
- Fuiman L, Batty R. What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. Journal of Experimental Biology, 1997; 200:1745-1755.
- Gabassi PG. Psicologia del lavoro nelle organizzazioni, Franco Angeli, Milano; 2003: 167.
- Gardeur JN, Lemarié G, Coves D, Boujard T. Typology of individual growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquatic Living Resources 2001; 14: 223-231.
- Georgalas V, Malavasi S, Franzoi P, Torricelli P. Swimming activity and feeding behaviour of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L): effects of ontogeny and increasing food density. Aquaculture, 2007; 264: 418-427.
- Gerlai R, Lahav SG, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2000; 67: 773-782.
- Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. Behavior Genetics, 2003; 33:461-468.
- Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2006; 85: 752-761.
- Giffard-Mena I, Boulo V, Abed C, Cramb G, Charmantier G. Expression and localization of Aquaporin 1a in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) during ontogeny. Frontiers in Physiology, 2011; 34: 1-13.
- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL. Effects of size and temperature on metabolic rate. Science, 2001; 293: 2248-2251.
- Gómez-Laplaza LM; Morgan E. Effects of short-term isolation on the locomotor activity of the angelfish (*Pterophyllum scalare*). Journal of Comparative Psychology, 1991; 105: 366-375.
- Gonzales RJ, McDonald DG. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. Journal of Experimental Biology, 1992; 163: 317-332.
- Granzotto A, Franzoi P, Longo A, Pranovi F, Torricelli P. La pesca nella laguna di Venezia: un percorso di sostenibilità nel recupero delle tradizioni. Lo stato dell'arte. Rapporto sullo sviluppo sostenibile, Fondazione Eni Enrico Mattei, 2001: 1-61.
- Grossman L, Stewart A, Gaikwad S, Utterback E, Wu N, DiLeo J, Frank K, Hart P, Howard A, Kalueff V. Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. Brain Research Bulletin, 2011; 85: 58-63.
- Hara JT. Role of olfaction in fish behavior. In: Behaviour of teleost fishes, (Pitcher TJ, ed), Chapman & Hall, London, 1993: 171-199.
- Harper C, Wolf JC. Morphologic effects of the stress response in fish. Ilar Journal, 2009; 50: 387-396.

- Harvey J, Harwell L, Summers JK. Contaminant concentrations in whole-body fish and shellfish from US estuaries. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2008; 137: 403-412.
- Hazel RJ, Prosser CL. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological Reviews*, 1974; 54: 620-688.
- Henry JP. Biological basis of the stress response. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 1992; 27: 66-83.
- Hoar WS, Robertson GB. Temperature resistance of goldfish maintained under controlled photoperiods. *Canadian Journal of Zoology*, 1959; 37: 419-428.
- Hoffmann AA, Parsons PA. *Evolutionary genetics and environmental stress*. Oxford University Press, 1991.
- Hughes BO, Duncan IJH. The notion of ethological 'need', models of motivation and animal welfare. *Animal Behaviour*, 1988, 36: 1696-1707.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). *Climate change 2007: synthesis report*. IPCC Secretariat, Geneva, Switzerland, 2007. Available at http://www.ipcc.ch/pdf/assessment_report/ar4/syr/ar4_syr.pdf.
- Israeli D, Kimmel E. Monitoring the behavior of hypoxia-stressed *Carassius auratus* using computer vision. *Acquacultural Engineering*, 1996; 15: 423-440.
- Iwama GK. Stress in Fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998; 851: 304-310.
- Jesuthasan S. Fear anxiety and control in the zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 2012; 72: 395-403.
- Jin Y, Chen R, Sun L, Liu W, Fu Z. Photoperiod and temperature influence endocrine disruptive chemical-mediated effects in male adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 2009; 92: 38-43.
- Jobling M. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature. In: *Global warning: implication for freshwater and marine fish* (Wood CM, McDonald DG, eds). Cambridge University Press, Cambridge, 1996: 225-253.
- Johnston IA, Clarke A, Ward P. Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific Ocean. *Marine Biology*, 1991; 109: 191-195.
- Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosenberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhauss SCF, Weng W, Bally-Cuif L, Schneider H, and the Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*, 2013; 10: 70-86.
- Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2014; 35: 63-75.
- Kane AS, Salierno JD, Brewer SK. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In: *Methods in Aquatic Toxicology* (Ostrander GK, ed), vol 2, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 2005: 559-590.

- Kily LJM, Cowe YCM, Hussain O, Patel S, McElwaine S, Cotter FE, Brennan CH. Gene expression changes in a zebrafish model of drug dependency suggest conservation of neuro-adaptation pathways. *Journal of Experimental Biology*, 2008; 211: 1623-1634.
- Knights B. Agonistic behaviour and growth in the European eel, *Anguilla anguilla* L., in relation to warm-water aquaculture. *Journal of Fish Biology*, 1987; 31: 265-276.
- Krause J, Loader SP, McDermott J, Ruxton GD. Refuge use by fish as a function of body length-related metabolic expenditure and predation risks. *Proceedings by the Royal Society B*, 1998; 265: 2373-2379.
- Kristiansen TS, Ferno A, Holm JC, Privitera L, Bakke S, Fosseidengen JE. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture*, 2004; 230: 137-151.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1999; 23: 925-935.
- Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 2001; 139: 817- 830.
- Koumoundouros G, Sfakianakis DG, Divanach P, Kentouri M. Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *Journal of Fish Biology*, 2002a; 60: 923-932.
- Koumoundouros G, Pavlidis M, Anezaki L, Kokkari C, Sterioti A, Divanach P, Kentouri M. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *Journal of Experimental Zoology*, 2002b; 292: 573-579.
- Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, 2007; 269: 1-20.
- Lefrancois C, Shingles A, Domenici P. The effect of hypoxia on locomotor performance and behavior during escape in the golden grey mullet (*Liza aurata*). *Journal of Fish Biology*, 2005; 67: 1-19.
- Lefrancois C, Domenici P. Locomotor kinematics and responsiveness in the escape behaviour of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to hypoxia. *Marine Biology*, 2006; 149: 969-977.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 2007; 90: 54-58.
- Lima SL. Stress and the decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive and ecological perspectives. In: *Advances in the study of behavior: stress and behavior* (Slater P, Møller AP, Milinski M, eds), Academic Press, 1998: 215-290.
- Little EE, Brewer SK. Neurobehavioral toxicity in fish. In: *Target organ toxicity in marine and freshwaters teleosts new perspectives: toxicology and the environment* (Schlenk D, Benson WH, eds), vol 2, Taylor and Francis, London and New York, 2001: 139-174.
- Liu S, Leach SD. Zebrafish models for cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2011; 6: 71-93.
- Lockwood B, BjerkeS, Kobayashi K, Guo S. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2004; 77: 647-654.

- López-Patiño MA, Yu L, Cabral H, Zhdanova IV. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 2008; 93: 160-171.
- Lutterschmidt WI, Hutchison VH. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 1997; 75: 1561-1574.
- Lymbery P. In too deep—the welfare of intensively farmed fish. *Compassion in world farming*. Petersfield Hampshire, 2002.
- Mackie AM, Mitchell AT. Chemical ecology and chemoreception in the marine environment. In: *Indices biochimiques et milieux marins. Actes et Colloques*, Publication CNEXO, 1982; 14: 11-24.
- Malavasi S, Cipolato G, Cioni C, Torricelli P, Alleva E, Manciocco A, Toni M. Effects of temperature on the antipredator behaviour and on the cholinergic expression in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *Ethology*, 2013; 119: 592-604.
- Mallat J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1985; 42: 630-648.
- Manciocco A, Calamandrei G, Alleva E. Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: the need of the etho-toxicology approach. *Chemosphere*, 2014: 1-7.
- Manciocco A, Toni M, Tedesco A, Malavasi S, Alleva E, Cioni C. The Acclimation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to temperature: behavioural and neurochemical responses. *Ethology*, 2015; 121: 68-83.
- Marple DN, Aberle ED, Forrest JC, Blake WH, Judge MD. Endocrine response of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *Journal of Animal Science*, 1972; 35: 576-579.
- Martins EG, Hinch SC, Patterson DA, Hague MJ, Cooke SJ, Miller KM, Lapointe MF, English KK, Farrell AP. Effects of river temperature and climate warming on stock-specific survival of adult migrating Fraser River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Global Change Biology*, 2011; 17: 99-114.
- Mason WA, Mendoza SP, Moberg GP. Persistent effects of early social experience on physiological responsiveness. In: *Primate today* (Ehara A, Kimura T, Takenaka D, Iwamoto M, eds). Elsevier Sciences Publisher, Amsterdam; 1991: 469-471.
- Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 2011; 219: 234-239.
- Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Animal*, 2002; 31: 34-40.
- Maximino C, Marques T, Dias F, Cortes FV, Flávia Volta, Taccolini IB, Pereira PM, Colmanetti R, Gazolla RA, Tavares RI, Rodrigues STK, Valéria S, Pontes AAA, Romão CF, Prado VM, Amauri GJ. A Comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, 2007; 20: 351-367.
- Maximino C, de Brito TM, Colmanetti R, Assis Pontes AA, de Castro HM, Tavares de Lacerda RI, Morato S, Gouvenia Jr A. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, 2010a; 210: 1-7.

- Maximino C, de Brito TM, da Silva Batista AW, Herculano AM, Morato S, Gouveia Jr A. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural Brain Research*, 2010b; 214: 157-171.
- Maximino C; de Brito TM, de Mattos Dias CAG, Gouveia Jr A, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 2010c; 5: 209-216.
- Maximino C, da Silva Batista AW, Gouveia Jr A, Herculano AM. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2011; 35: 624-631.
- McClelland GB, Craig PM, Dhekney K, Dipardo S. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Physiology*, 2006; 577: 739-751.
- McCormick SD, Shrimpton JM, Carey JB, O'Dea MF, Sloan KE, Moriyama S, Björnsson BTh. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 1998; 168: 221-235.
- Meliska CJ, Meliska JA, Peeke HVS. The relationship of mirror-elicited display to combat behaviors in *Betta splendens*. *Behavioural and Neural Biology*, 1980; 30: 207-217.
- Metcalf JD, Butler PJ. Changes in activity and ventilation in response to hypoxia in unrestrained, unoperated dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). *The Journal of Experimental Biology*, 1984; 180: 153-162.
- Miklosi A, Andrew RJ, Savage H. Behavioural lateralization of the tetrapod type in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Physiology and Behavior* 1997; 63: 127-135.
- Milinski M. TIT FOR TAT in sticklebacks and the evolution of cooperation. *Nature*, 1987; 325: 433-435.
- Miller ME. Mortality of fishes due to cold on the southeast Florida coast. *Ecology*, 1940; 21: 420-421.
- Miller N, Gerlai R. Quantification of shoaling behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 2007; 184: 157-166.
- Moberg GP. Biological Response to Stress: Key to Assessment of Animal Well-Being? In: *Animal Stress* (Moberg GP, ed), Springer New York, 1985: 27-49.
- Moberg GP. When does stress become distress? *Lab animal*, 1999; 28: 22-26.
- Moberg GP. Biological response to stress: implication for animal welfare. In: *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare* (Moberg GP, Mench JA, eds). CABI Publishing, 2000: 1-21.
- Moretz JA, Martins EP, Robison BD. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, 2007; 18: 556-562.
- Mundahl ND. Heat death of fish in shrinking stream pools. *American Midland Naturalist*, 1990; 123: 40-46.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, 2006; 39: 262-274.

- Norton W, Bally-Cuif L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*, 2007; 11: 90-101.
- Oliveira RF, Silva JF, Simoes J. Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish*, 2011; 8: 73-81.
- Olla BL, Davis MW, Schreck CB. Notes: Comparison of predator avoidance capabilities with corticosteroid levels induced by stress in juvenile coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1992; 121: 544-547.
- Olla BL, Davis MW, Ryer CH. Understanding how the hatchery environment represses or promotes the development of behavioural survival skills. *Bulletin of Marine Science*, 1998; 62: 531-550.
- Olsson AS, Nevison CM, Patterson-Kane EG, Sherwin CM, Van de Weerd HA, Würbel H. Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*, 2003: 245-264.
- Ottersen G, Alheit J, Drinkwater K, Friedland K, Hagen E, Stenseth NC. The response of fish populations to ocean climate fluctuations. In: *Marine ecosystems and climate variation* (Stenseth NC, Ottersen G, eds), Oxford University Press, 2004: 73-94.
- Pavlidis M, Koumoundouros G, Sterioti A, Kentouri M. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Zoology*, 2000; 287: 225-232.
- Peck LS, Conway LZ. The myth of cold adaptation: oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. Geological Society, London, Special Publications, 2000; 177: 441-450.
- Peres H, Oliva-Teles A. Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 1999; 102, 337-348.
- Perneger TV. What wrong with Bonferroni adjustments. *British Medical Journal*, 1998; 316: 1236-1238.
- Person-Le Ruyet J, Mahe K, Le Bayon N, Le Delliou H. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 2004; 237, 269-280.
- Peters G. The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Fish Biology*, 1982; 21: 497-512.
- Pichavant K, Person-Le Ruyet J, Le Bayon N, Sévère A, le Roux A, Boeuf G. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 2001: 59, 875-883.
- Pickering AD, Pottinger TG, Christie P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, 1982; 20: 229-244.
- Pickett GD, Pawson MG. Sea bass: biology, exploitation and conservation (Pickett GD, Pawson MG, eds), Chapman & Hall, London, 1994.
- Pörtner HO, Knust R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 2007; 315: 95-97.

Postlethwaite TG, McDonald DG. Mechanism of Na⁺ and Cl⁻ regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *Journal of Experimental Biology*, 1995; 198: 295-304.

Powers DA. Fish as model systems. *Science*, 1989; 246: 352-358.

Pritchard VL, Lawrence J, Butlin RK, Krause J. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*, 2001; 62: 1085-1088.

Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 1997a; 85:57-69.

Ramos A, Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1997b; 22:33-57.

Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izídio GS. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research*, 2008; 193: 277-288.

Reed B, Jennings M. Guidance on the housing and care of zebrafish, *Danio rerio*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA, 2010.

Reidy SP, Kerr SR, Nelson JA. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *The Journal of Experimental Biology*, 2000; 203: 347-357.

Renier C, Faraco J, Bourgin P, Motley T, Bonaventure P, Rosa F, Mignot E. Genomics and functional conservation of sedative-hypnotic targets in the zebrafish. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2007; 17: 237-253.

REPORT FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL AND THE EUROPEAN PARLIAMENT. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. 05/12/2013.

Riehl R, Kyzar E, Allain A, Green J, Hook M, Monnig L, Rhymes K, Roth A, Pham M, Razavi R, DiLeo J, Gaikwad S, Hart P, Kalueff AV. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 2011; 33: 658-667.

Robison BD, Rowland W. A potential model system for studying the genetics of domestication: behavioral variation among wild and domesticated strains of zebra danio (*Danio rerio*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2005; 62: 2046-2054.

Sackerman J, Donegan JJ, Chunningham CS, Nguyen NN, Lawless K, Long A, Benno RH, Gould GG. Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *International Journal of Comparative Psychology*, 2010; 23: 43-61.

Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012; 122: 2337-2343.

Santos GA, Schrama JW, Mamauag REP, Rombout JHWM, Verreth JAJ. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture*, 2010; 299: 73-80.

Schaefer J, Ryan A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 2006; 69: 722-734.

- Scherer E, Harrison SE. Exogenous control of diel locomotor activity in the whitefish, *Coregonus clupeaformis*: effects of light and temperature. *Oecologia*, 1988; 76: 254-260.
- Schreck CB. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: *Stress and Fish* (Pickering AD, ed), London: Academic, 1981: 295-321.
- Schreck CB. Physiological, behavioural, and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium*, 1990; 8: 29-37.
- Schreck CB, Olla BL, Davis MW. Behavioral response to stress. In: *Fish stress and health in aquaculture* (Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB, eds). Cambridge University Press, 1997: 145-161.
- Schreck CB. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: *the biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare* (Moberg GP, Mench JA, eds), CABI Publishing, 2000: 147-158.
- Schreck CB. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 2010; 165: 549-556.
- Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 1936; 138: 30-32.
- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1999; 32: 1551-1553.
- Simpson, A.C. Some observations on the mortality of fish and the distribution of plankton in the southern North Sea during the cold winter, 1946-1947. *Journal du Conseil*, 1953; 19: 150-177.
- Sogard SM. Size-selective mortality in the juvenile stage of teleost fishes: a review. *Bulletin of Marine Science*, 1997; 60: 1129-1157.
- Somero GN. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology*, 2000; 42: 780-789.
- Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 2008; 188: 168-177.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. the behavior and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 2008; 83: 13-34.
- Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, Mohideen MA, Neuhauss SC, Solnica-Krezel L, Schier AF, Zwartkruis F, Stemple DL, Malicki J, Driever W, Fishman MC. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*, 1996; 123: 285-292.
- Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. *Behavioural Brain Research*, 2011; 222: 15-25.
- Stephenson JF, Whitlock KE, Partridge JC. Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. *Zebrafish*, 2011; 8: 17-22.

- Stewart A, Kadri F, Di Leo J, Chung KM, Cachat J, Goodspeed J, Sociu C, Roy S, Gaikwad S, Wong K, Elegante M, Elkhayat S, Wu N, Gilder T, Tien D, Grossman L, Tan J, Denmark A, Bartels B, Frank K, Beeson E, Kalueff AV. The developing utility of zebrafish in modeling neurobehavioral disorders. *International Journal of Comparative Psychology*, 2010; 23: 104-121.
- Stewart A, Riehl R, Wong K, Green J, Cosgrove J, Vollmer K, Kyzar E, Hart P, Allain A, Cachat J, Gaikwad S, Hook M, Rhymes K, Newman A, Utterback E, Chang K, Kalueff AV. Behavioral effects of MDMA ("Ecstasy") on adult zebrafish. *Behavioural Pharmacology*, 2011; 22: 275-280.
- Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff AV. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. *Neuropharmacology*, 2012; 62: 135-143.
- Sullivan JF, Atchison GJ, D. Kolar DJ, McIntosh AW. Changes in the predator-prey behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) caused by cadmium. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1978; 35: 446-451.
- Swanhart LM, Cosentino CC, Diep CQ, Davidson AJ, de Caestecker M, Hukriede NA. Zebrafish kidney development: basic science to translational research. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today Reviews*, 2011; 93: 141-159.
- Taylor EW, Barrett DJ. Evidence of a respiratory role for the hypoxic bradycardia in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1985; 80: 99-102.
- Trullas RE, Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 1993; 44:463-469.
- Tsubokawa T, Saito K, Kawano H, Kawamura K, Shinozuka K, Watanabe S. Pharmacological effects on mirror approaching behaviour and neurochemical aspects of the telencephalon in the fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Social Neuroscience*, 2009; 9: 1-11.
- Valiela I, McClelland J, Hauxwell J, Behr PJ, Hersh D, Foreman K. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnology and Oceanography*; 1997, 42: 1105-1118.
- van Ginneken V, van den Thillart G. Metabolic depression in fish measured by direct calorimetry: a review. *Thermochimica Acta*, 2009; 483: 1-7.
- Vergauwen L, Benoot D, Blust R, Knapen D. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010; 157: 149-157.
- Ward A, Thomas P, Hart P, Krause J. Correlates of boldness in threespined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2004; 55: 561-568.
- Wechsler B. Coping and coping strategies: a behavioural view. *Applied Animal Behaviour Science*, 1995; 43: 123-134.
- Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997; 3: 591-625.
- Wieser W, Kaufmann R. A note on interactions between temperature, viscosity, body size and swimming energetics in fish larvae. *Journal of Experimental Biology*, 1998; 201:1369-1372.

Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, Goodspeed J, Suci C, Tan J, Grimes C, Chung A, Rosenberg M, Gaikwad S, Denmark A, Jackson A, Kadri F, Chung KM, Steward A, Gilder T, Beeson E, Zapolsky I, Wu N, Cachat J, Kalueff AV. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). Behavioural Brain Research, 2010; 208: 450-457.

Wright D, Rimmer L, Pritchard VL, Butlin RK, Krause J. Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Fish Biology, 2003; 63: 258-259.

Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2011; 11: 274-282.

Zimmerman C, Hubold G. Respiration and activity of Arctic and Antarctic fish with different modes of life: a multivariate analysis of experimental data. In: Fishes of Antarctica: A Biological Overview (di Prisco G, Pisano E, Clarke A, eds), Springer-Verlag, 1998: 163-174

Zon LI. Zebrafish: a new model for human disease. Genome Research, 1999; 9: 99-100.

Siti web consultati

http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/seabass/index_it.htm

Ringraziamenti

Il termine del mio dottorato arriva quando già sono immersa con gran parte dei miei pensieri in un'altra avventura, quindi qui sento di voler ringraziare non solo le persone che hanno contribuito al mio lavoro scientifico, ma anche tutte le persone che sono state un aiuto ed un sostegno in questi anni, a volte ispirandomi senza neppure esserne a conoscenza.

Il primo ringraziamento va al Prof. Enrico Alleva, per avermi dato l'opportunità di condurre questo studio e far parte del suo Reparto. Mentore di alcuni degli insegnamenti più importanti della mia vita, lasciar scorrere sempre tutto e decidere da sola quali sono le cose a cui dare la priorità.

Un enorme grazie va al Dott. Augusto Vitale, tutor del mio dottorato, che ha dato un prezioso contributo nel momento finale di questo lavoro, incitandomi a dare il massimo nel compiere l'ultimo sforzo.

Il ringraziamento più grande va alla Dott.ssa Arianna Manciocco, amica e co-tutor, preziosa compagna di mille dubbi e mille e una soluzioni (per fortuna). Senza di lei questo lavoro non sarebbe stato ideato e questi anni non sarebbero stati così ricchi di ricordi e di bellissime emozioni.

Senza l'aiuto della preziosa ed eccezionale Dott.ssa Flavia Chiarotti, la statistica non mi sarebbe interessata tanto e non avrei imparato così tante cose. A lei devo la voglia di voler sempre comprendere cosa sto facendo con un campione, perché tutto sommato la statistica può anche esser molto divertente.

Al Dott. Tommaso Luca Bonsignore devo troppe cose, non basterebbero mille pagine per ringraziarlo di tutto quello che ha fatto, per la mia tesi di dottorato e per Amanda. Amico di eccezionale sensibilità, a lui devo tantissimo per la mia crescita tecnica, ma, soprattutto, per la mia crescita personale.

Il caro Dott. Simone Macrì nell'ultimo anno è stato un insostituibile aiuto scientifico, dal quale ho imparato tantissime cose e a cui devo la voglia di essere ancora più rigorosa e precisa nel mio lavoro. Anche se gli aiuti più preziosi che mi ha dato sono stati la sua amicizia, i suoi consigli e il suo sostegno che, in alcuni momenti di questo percorso, sono stati fondamentali per non perdere la mia serenità.

Alla mia compagna di ufficio, la Dott.ssa Pamela Panetta, va un ringraziamento speciale, per la compagna e per le chiacchierate nella nostra stanzetta, tanta serenità e comprensione non potranno mai esser sostituite.

E poi il "mio" Reparto di Neuroscienze comportamentali ha tantissimi altri componenti che vorrei poter ringraziare adeguatamente uno per uno, poichè tutti mi hanno regalato dei momenti bellissimi. Ogni volta che ho bussato alla porta di qualcuno con un dubbio o un problema, ho trovato persone disposte sempre a dedicarmi qualche minuto o qualche ora. A tutti loro devo tantissimi ricordi stupendi, pause pranzo divertenti e risate. Sono una traccia bellissima in questi tre anni di vita.

Ringrazio anche il gruppo dell'Università Sapienza, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Dott. Mattia Toni, Prof.ssa Carla Cioni e Dott.ssa Federica De Angelis, per aver

partecipato alla stesura e allo svolgimento di questo progetto. A Federica devo anche tantissime risate che, nel bel mezzo di giornate lavorative pesanti, sono state un toccasana eccezionale.

Un sentito ringraziamento anche al Prof. Franco Cotelli e alla Dott.ssa Silvia Carra, del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Milano, per l'aiuto tecnico che mi hanno fornito quando ho iniziato lo studio sul pesce zebra. Se mi sono appassionata tanto a questo piccolo pesce lo devo anche all'entusiasmo che loro sono riusciti a trasmettermi.

Un grazie straniero (*mange tak*) va al gruppo dell'Università di Copenhagen, *Department of Veterinary Disease Biology, Laboratory of Aquatic Pathobiology*, che mi ha ospitato; in particolar modo il Prof. Kurt Buchmann che mi ha accolto nel suo staff e che mi ha permesso di fare una bellissima esperienza di studio e di vita. Tutti i componenti del suo gruppo sono stati eccezionali con me, permettendomi di entrare in contatto con tantissime culture, una più bella dell'altra. Un grazie particolare al Dott. Per Walter Kania e al Dott. Rezgar Jaafar Mohammad, per le piacevoli e bellissime chiacchierate.

Il grazie più sentito va alla mia famiglia, sostegno anche nelle mie scelte più incaute e folli, da sempre rassegnata ad avere una figlia ed una sorella che "vuole capire gli animali". Sapere di avere qualcuno che "fa il tifo per me" anche negli insuccessi e nelle cadute è un grande incoraggiamento.

A mia sorella Ambra va un ringraziamento particolare, amica difficile ma sempre presente, capace di farmi ridere anche nelle peggiori situazioni grazie alla sua arguzia e al suo spirito.

Il ringraziamento più profondo e totale va a Cristiano Varrone, compagno di vita in questa esperienza, resa bellissima grazie semplicemente alla sua presenza nella mia quotidianità. Il sostegno costante, la pazienza dimostrata e il suo amore per me sono stati il fondamento per la mia serenità e per la mia felicità. Ora so che parlare lingue differenti può non essere un ostacolo, l'importante è volerlo. E so che tutti i momenti peggiori possono esser tramutati in momenti lieti, basta un semplice buffetto sul naso.

Un pensiero speciale va alla famiglia Varrone, per avermi accolta come una figlia e per le lunghe telefonate che, qualunque problema avessi, mi hanno sempre rasserenata.

Ai proprietari del negozio Aquarium di Roma, Eugenio Calderone e Marco Antonini, devo un ringraziamento particolare. Ogni dubbio, ogni domanda, ogni più piccola questione sulla gestione degli animali con loro ha trovato una risposta. Dispensatori di consigli e aiuto, mi hanno dato sicurezza nelle scelte che facevo per gli animali.

Un ultimo pensiero va ai pesci. Quando ho iniziato questo lavoro non immaginavo quanto potesse esser complesso il comportamento di un pesce, e non pensavo si potesse creare così tanta empatia con questi animali. Spero veramente di esser sempre riuscita a farli stare bene e che il mio lavoro possa dare un contributo per migliorare la condizione degli animali che vengono allevati in cattività.

Studiare il comportamento degli animali è un'avventura fantastica, non priva di difficoltà, che richiede impegno, dedizione, sacrifici e tanta curiosità. Mi è stata data un'occasione bellissima, che mi ha permesso di crescere non solo scientificamente e professionalmente, ma anche umanamente, poiché il costante confronto con persone che sono molto più brave di me, nel lavoro e nella vita, mi è stato di esempio per cercare di fare sempre il meglio. A tutti coloro che ho dimenticato, ma che

sono stati parte di questo percorso, nel bene e nel male, devo un ringraziamento, perché in qualunque modo siano entrati in contatto con la mia vita ne hanno in qualche modo modificato il percorso, dandomi la possibilità di essere oggi quella che sono.